

MIRIAM BLUMEL CHOCIAI

# Pré-Tratamento Fosfórico de Fitobiomassa Residual e Bioconversão de Pentoses

Tese apresentada à Coordenação do Curso  
de Pós-Graduação em Bioquímica da Uni-  
versidade Federal do Paraná, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.

CURITIBA  
1987

Tese orientada pelo

Prof. Dr. JOSÉ DOMINGOS FONTANA

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido JORGE,  
e aos meus pais  
WALTER e IRENE,  
com carinho.

## HOMENAGEM

Ao Prof. Dr. JOSÉ DOMINGOS FONTANA  
pela sábia orientação e constante  
incentivo, apoio, confiança e ami-  
zade, demonstrados durante a execu-  
ção deste trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Bonifácio José Gallotti, pelo constante apoio e incentivo, na iniciação e aperfeiçoamento da carreira do Magistério Superior.

Aos professores Dr. Luiz Alberto S. Veiga, Dr. João Batista Chaves Corrêa e Dr. Manoel Francisco Guimarães, pelas sugestões apresentadas após leitura criteriosa dos originais.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo apoio sempre demonstrado.

Aos professores Dr. José Hazencleve Duarte, Dr. João Batista Chaves Corrêa e Dra. Fany Reicher, pelas colaborações prestadas.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelos ensinamentos ministrados.

Aos professores Munif Gebara, Aneli de Melo Barbosa e Maria Célia O. Hauly, pelo agradável convívio no laboratório.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Kazuko H. Nasimento, e às amigas Madalena Baron, Monica H.C. Grochocki, Maria de Lourdes C.C. Silva, Nina Waszcynskyi, Sandra W. Zanin e Stela Maris Romanowski, pela amizade e companheirismo.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho de tese.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIX
RESUMO .....	XX

### INTRODUÇÃO

1.	O PROBLEMA ENERGÉTICO MUNDIAL .....	1
2.	BIOMASSA .....	5
3.	PRÉ-TRATAMENTOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	18
3.1.	Pré-tratamentos físicos .....	18
3.1.1.	Moinho de bolas .....	20
3.1.2.	Moinho de dois rolos .....	21
3.1.3.	Moinho de martelos .....	21
3.1.4.	Moinho de colóide .....	21
3.1.5.	Moinho de vibração .....	21
3.1.6.	Moagem úmida .....	22
3.1.7.	Pirólise .....	22
3.1.8.	Radiação de alta energia .....	23
3.2.	Pré-tratamentos físico-químicos .....	23
3.2.1.	Vapor a alta pressão .....	23
3.2.2.	Explosão pelo vapor .....	24
3.2.3.	Explosão pelo congelamento .....	25
3.3.	Pré-tratamentos químicos .....	25
3.3.1.	Álcalis .....	26
3.3.2.	Ácidos .....	26
3.3.3.	Gases .....	31
3.3.4.	Agentes oxidantes .....	32
3.3.5.	Solventes de celulose .....	33

3.3.6.	Extração por solventes .....	34
3.3.7.	Agentes inchadores .....	34
3.4.	Pré-tratamentos biológicos .....	35
4.	FERMENTAÇÃO DE PENTOSSES .....	38
4.1.	Fermentação indireta de pentoses com emprego de xilose-isomerase .....	38
4.2.	Fermentação direta das pentoses a etanol ....	43
4.2.1.	Conversão bacteriana de pentoses .....	43
4.2.2.	Conversão de pentoses por fungos .....	45
4.2.3.	Conversão de pentoses por leveduras .....	47
5.	RENDIMENTOS .....	51
5.1.	Toxicidade do etanol formado .....	52
5.2.	Formação de sub-produtos .....	54
5.3.	Consumo do etanol formado .....	56
6.	FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE FITOBIOMASSA .	59
OBJETIVOS .....		63
MATERIAIS E MÉTODOS .....		65
1.	MATERIAIS .....	65
2.	MÉTODOS .....	65
2.1.	Métodos gerais .....	65
2.2.	Métodos analíticos .....	66
2.2.1.	Métodos colorimétricos .....	66
2.2.2.	Métodos cromatográficos .....	67
2.2.3.	Método turbidimétrico .....	68
2.2.4.	Métodos gravimétricos .....	69
2.3.	Moagem e lavagem dos resíduos .....	69
2.4.	Hidrólise .....	70
2.4.1.	Relação catalisador : biomassa .....	70
2.4.2.	Potencial do $H_3PO_4$ como alternativa de hidró lise para pentosanas .....	70
2.4.3.	Rehidrólise do bagaço residual .....	71
2.4.4.	Força destrutiva de ácidos minerais .....	71
2.4.5.	Avaliação de parâmetros cinéticos da hidróli se fosfórica .....	71
2.4.6.	Limite mínimo de catalisador .....	72

2.4.7.	Hidrólises fosfóricas e solvólises compara- tivas de Angiospermas e Gimnospermas .....	73
2.4.8.	Hidrólise fosfórica de bagaços de cana e de sorgo, previamente clorados .....	74
2.4.9.	Tratamento dos hidrolisados .....	74
2.5.	Processo fermentativo .....	75
2.5.1.	Microrganismos .....	75
2.5.2.	Meios de cultura empregados .....	75
2.5.3.	Conservação das amostras .....	76
2.5.4.	Preparo do inóculo .....	76
2.5.5.	Fermentação propriamente dita .....	77
2.5.5.1.	Experimentos fermentativos onde a <u>D</u> -xilose p.a. foi a fonte de carbono usada .....	77
2.5.5.1.1.	Efeito dos íons fosfato para a levedura <u>Pa-</u> <u>chysolen tannophilus</u> .....	77
2.5.5.1.2.	Efeito dos íons fosfato para o fungo <u>Fusa-</u> <u>rium oxysporum</u> .....	78
2.5.5.1.3.	Determinação do pH ótimo para a levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	78
2.5.5.1.4.	Determinação do pH ótimo para a levedura <u>Candida shehatae</u> .....	79
2.5.5.1.5.	Determinação do pH ótimo para o fungo <u>Fusa-</u> <u>rium oxysporum</u> .....	79
2.5.5.1.6.	Influência dos íons cloreto e sulfato no crescimento da levedura <u>Pachysolen tannophi-</u> <u>lus</u> e do fungo <u>Fusarium oxysporum</u> .....	79
2.5.5.2.	Experimentos fermentativos onde foram utili- zados os hidrolisados fosfóricos como fonte de carbono .....	80
2.5.5.2.1.	Efeito da suplementação de hidrolisados áci- dos de bagaço de cana com solução de sais minerais e diferentes fontes de nitrogênio, na fermentação com <u>Pachysolen tannophilus</u> e <u>Fusarium oxysporum</u> .....	81

2.5.5.2.2.	Efeito da suplementação de hidrolisados ácidos de serragem de <u>Pinus</u> , com solução de sais minerais e extrato de levedura, na fermentação com <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	81
2.5.5.2.3.	Influência da idade do inóculo de <u>Pachysolen tannophilus</u> , na fermentação de hidrolisados ácidos de serragem de <u>Pinus</u> .....	82
2.5.5.2.4.	Influência da pressão empregada durante a hidrólise fosfórica de serragem de <u>Pinus</u> , na capacidade fermentativa da levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	83
2.5.5.2.5.	Comparação da habilidade fermentativa das leveduras <u>Pachysolen tannophilus</u> , <u>Pachysolen tannophilus</u> 2, <u>Candida shehatae</u> 1 e <u>Pichia stipitis</u> 6, em soluções de <u>D</u> -xilose p.a. ou hidrolisados ácidos de bagaço de cana e serragem de <u>Pinus</u> .....	83
2.5.5.2.6.	Comparação da habilidade fermentativa das leveduras <u>Pachysolen tannophilus</u> , <u>Pachysolen tannophilus</u> 2, <u>Candida shehatae</u> 1 e <u>Pichia stipitis</u> 6, em hidrolisados ácidos de bagaço de cana, clarificados de compostos fenólicos .....	84
2.6.	Sacarificação enzimática .....	85
2.6.1.	Sacarificação enzimática de bagaços de cana e de sorgo, previamente clorados .....	85
2.6.2.	Influência do grau de umidade do bagaço hidrolisado, na posterior sacarificação enzimática .....	85
2.6.3.	Inibição da sacarificação enzimática pelo carboidrato redutor liberado .....	85
2.6.4.	Sacarificação enzimática de bagaço de cana e de sorgo solvolisados, hidrolisados e solvolisados e hidrolisados .....	86
2.6.5.	Sacarificação enzimática de bagaço de cana residual após hidrólise fosfórica na câmara	

de combustão de Parr .....	87
RESULTADOS .....	88
DISCUSSÃO .....	192
CONCLUSÕES .....	213
APÊNDICE: Temperaturas do vapor saturado da água em ° Cen <u>tí</u> grados correspondentes a pressões de manôme - tro, em atmosferas .....	217
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	218

## LISTA DE TABELAS

TABELA		Páginas
I	Influência da relação biomassa residual : ácido diluído, na hidrólise fosfórica de serragem de Pinus, com $H_3PO_4$ a 0,5% v/v a 2 atmosferas, durante 2 horas e 30 minutos .....	89
II	Potencial do $H_3PO_4$ como alternativa de hidrólise para pentosanas .....	91
III	Reverificação da eficiência da hidrólise fosfórica .....	93
IV	Hidrólise fosfórica comparativa de Angiospermas e Gimnospermas com $H_3PO_4$ a 0,5% v/v e pressões de 5 e 6 atmosferas .....	109
V	Hidrólise fosfórica ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2 atmosferas; 1 hora) de bagaço de cana e de sorgo, previamente clorados .....	112
VI	Extração de hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$ a 0,125% v/v; 10 atmosferas) de bagaço de cana com clorofórmio, acetato de etila e carvão ativo ..	114
VII	Efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	116
VIII	Efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pelo fungo <u>Fusarium oxysporum</u> ...	119
IX	Determinação do pH ótimo para a levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	122
X	Determinação do pH ótimo para o fungo <u>Fusarium oxysporum</u> .....	126
XI	Determinação do pH ótimo para a levedura <u>Candida shehatae</u> .....	127

XII	Influência dos íons cloreto e sulfato no crescimento da levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	130
XIII	Influência dos íons cloreto e sulfato no crescimento do fungo <u>Fusarium oxysporum</u> .....	133
XIV	Efeito da suplementação de hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2,25 atm; 2 horas) com solução de sais minerais e diversas fontes de nitrogênio, na fermentação com a levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	136
XV	Efeito da suplementação de hidrolisados fosfóricos de serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2 atm; 2 horas) com sais minerais e extrato de levedura na fermentação com a levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	141
XVI	Influência da idade do inóculo na fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2 atm; 2 horas e 30 minutos) pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	144
XVII	Influência da pressão empregada durante a hidrólise fosfórica de serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2 atm; 2 horas e 30 minutos ou 6 atm durante 1 minuto) na capacidade fermentativa da levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	151
XVIII	Composição qualitativa de monossacarídeos, obtida por g.l.c., de hidrolisados fosfóricos de serragem de <u>Pinus</u> obtidos com 0,5% v/v de $H_3PO_4$ a 2 atm e 6 atm de pressão .....	154
XIX	Comparação da habilidade fermentativa das leveduras <u>Pachysolen tannophilus</u> , <u>Pachysolen tannophilus</u> 2, <u>Candida shehatae</u> 1 e <u>Pichia stipitis</u> 6 em soluções de <u>D</u> -xilose p.a. ou hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ou serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrados)	157



XX	Comparação da habilidade fermentativa das leveduras <u>Pachysolen tannophilus</u> , <u>Pachysolen tannophilus</u> 2, <u>Candida shehatae</u> 1 e <u>Pichia stipitis</u> 6, em hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrados) clarificados de compostos fenólicos .....	170
XXI	Sacarificação enzimática de resíduos de hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 1 hora; 2 atmosferas) de bagaço de cana e de sorgo previamente clorados .....	185
XXII	Influência da umidade do bagaço de cana após a hidrólise a 0,5 atm durante 2 horas e 30 minutos com $H_3PO_4$ 0,5% v/v, na sacarificação enzimática .....	186
XXIII	Inibição da sacarificação enzimática pelo carboidrato redutor liberado .....	186
XXIV	Sacarificação enzimática de bagaços de cana e de sorgo, solvolisados, hidrolisados e solvolisados/hidrolisados .....	189
XXV	Sacarificação enzimática de bagaço de cana residual após hidrólise fosfórica em câmara de combustão de Parr .....	190

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Páginas
1	Classificação botânica dos 4 modelos de fitobio- massa nativa ou residual, abordados neste traba- lho de tese .....	6
2	Estrutura da parede celular de uma fibra vegetal	8
3	Estrutura de uma <u>O</u> -acetil-(4- <u>O</u> -metil-glucurono) xilana .....	11
4	Distribuição da celulose, hemiceluloses e ligni- na no interior da parede celular .....	16
5	Teores dos diversos componentes celulares em ma- deiras duras e madeiras moles .....	17
6	Metabolismo da <u>D</u> -xilose em leveduras .....	42
7	Quadro comparativo do metabolismo das pentoses ( <u>D</u> -xilose) em bactérias, leveduras e fungos fila- mentosos .....	44
8	Avaliação da quantidade de furfural formada du- rante a solvólise e hidrólise fosfórica, clorí- drica e sulfúrica (ácidos a 0,5% p/v; 2 atm; 2 ho- ras) por g.l.c. em coluna de Porapak Q à tempera- tura de 180°C .....	92
9	Composição em monossacarídeos de bagaço de cana e de sorgo, submetidos à solvólise e/ou hidróli- se fosfórica ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2 atm; 2 horas) ..	94
10	Efeito da concentração de $H_3PO_4$ e tempo de resi- dência na liberação de CT e CR durante a hidróli- se de bagaço de sorgo, sob pressão constante de 2,5 atm .....	97
11	Efeito da concentração de $H_3PO_4$ e pressões variá- veis na liberação de CT e CR durante a hidrólise de bagaço de sorgo, fixando-se o tempo em 1 hora	99

12	Efeito da concentração de $H_3PO_4$ na hidrólise de bagaço de cana, sob temperatura (170°C) e tempo de residência (1 hora e 15 minutos) constantes.	102
13	Efeito da temperatura na hidrólise de bagaço de cana, sob $H_3PO_4$ (0,0625% v/v) e tempo de residência (1 hora e 15 minutos) constantes .....	103
14	Solvólises comparativas de resíduos de Angiospermas e Gimnospermas, realizadas em reator sob pressões de 3, 4, 5 e 6 atm.....	104
15	Hidrólise fosfórica comparativa de resíduos de Angiospermas e Gimnospermas, realizadas com $H_3PO_4$ 0,1% v/v e pressões de 3, 4 e 5 atm .....	106
16	Hidrólise fosfórica comparativa de resíduos de Angiospermas e Gimnospermas, realizadas sob pressão de 5 atm e concentrações de $H_3PO_4$ de 0,1% ; 0,25% e 0,5% v/v .....	107
17	Análise por g.l.c. dos solvolisados (6 atm) de Angiospermas e Gimnospermas, na forma de seus acetatos de alditóis .....	108
18	Análise por g.l.c. dos hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 6 atm) de Angiospermas e Gimnospermas, na forma de seus acetatos de alditóis .	111
19	Comportamento da levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> em solução de <u>D</u> -xilose a 3g% em pH 4,0 e em pH 5,0 .....	124
20	Influência da idade do inóculo no crescimento , consumo de CT e CR e produção de etanol pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> , durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,5% v/v; 2 atm; 2 horas e 30 minutos) .....	146
21	Análise qualitativa por g.l.c. do perfil de açúcares, presentes durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de <u>Pinus</u> (6 atm; $H_3PO_4$ 0,5% v/v) com a levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	155

22	Fermentação de uma solução de <u>D</u> -xilose a 4,5g% , suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen</u> <u>tannophilus</u> .....	161
23	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concen - trado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vo gel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedu- ra <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	162
24	Fermentação de hidrolisado de serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pa</u> - <u>chysolen tannophilus</u> .....	163
25	Fermentação de uma solução de <u>D</u> -xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, com a levedura <u>Pa</u> - <u>chysolen tannophilus</u> 2 .....	164
26	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes con - centrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela leve- dura <u>Pachysolen tannophilus</u> 2 .....	165
27	Fermentação de hidrolisado fosfórico de serragem de <u>Pinus</u> ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes con- centrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela leve- dura <u>Pachysolen tannophilus</u> 2 .....	166
28	Fermentação de uma solução de <u>D</u> -xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Can</u> - <u>dida shehatae</u> 1 .....	167
29	Fermentação de uma solução de <u>D</u> -xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pi</u> - <u>chia stipitis</u> 6 .....	168

30	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_3$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), sem prévia clarificação e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	174
31	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), tratado com clorofórmio e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	175
32	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> .....	176
33	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), sem prévia clarificação e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> 2 .....	177
34	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), tratado com clorofórmio e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> 2.....	178
35	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pachysolen tannophilus</u> 2 .....	179

36	Fermentação de hidrolisado fósforico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Candida shehatae</u> 1 .....	180
37	Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$ 0,125% v/v; 10 atm; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura <u>Pichia stipitis</u> 6 .....	181

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	-	Angström
atm	-	Atmosfera
CR	-	Carbohidrato redutor
CT	-	Carbohidrato total
d.i.	-	Diâmetro interno
DMSO	-	Dimetil sulfóxido
DO	-	Densidade ótica
EMP	-	Embden-Meyerhof-Parnas
g	-	Grama
g.l.c.	-	Cromatografia líquida-gasosa
ha	-	Hectare
Kcal	-	Quilocaloria
Kg	-	Quilograma
Km <sup>2</sup>	-	Quilômetro quadrado
l	-	Litro
M	-	Molaridade
min	-	Minuto
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
N	-	Normalidade
nm	-	Nanômetro
p/p	-	Peso/peso
p/v	-	Peso/volume
rpm	-	Rotações por minuto
T	-	Temperatura
v/p	-	Volume/peso
VPP	-	Via das pentoses-fosfato
v/v	-	Volume/volume
VVM	-	Volume/volume/minuto

## RESUMO

Dentro da crescente estratégia de processamento químico e biotecnológico para a fitobiomassa, é postulada uma tecnologia inovadora para a conversão de resíduos lignohemicelulósicos da atividade agrícola e florestal: o pré-tratamento com **ÁCIDO FOSFÓRICO DILUÍDO**, mediante pressão e aquecimento.

A aplicabilidade desta nova metodologia a modelos lignopolissacarídicos diferenciados, como os de vegetais angiospérmicos (gramíneas = bagaço de cana e sorgo; leguminosas = bractanga) e gimnospérmicos (coníferas = Pinus), foi comprovada em função de:

A) Seletividade da ação hidrolítica catalisada pelo ácido fosfórico, cujo alvo exclusivo é a fração hemicelulósica. Na hidrólise total, a composição de açúcares livres obtidos reflete aquela nativa de cada modelo de fitobiomassa:

1. D-xilose » L-arabinose » Ácido aldobiurônico para o caso das Angiospermas, ficando os substituintes ácidos concentrados em blocos dissacarídicos, em função da ordem de resistência à hidrólise ácida: Ácido urônico » D-xilose > L-arabinose.

2. D-manose » D-xilose > D-galactose > D-glucose > L-arabinose no caso das Gimnospermas, advindo a D-glucose de heteromananas.

B) Paralelamente, há recuperação da lignocelulose, mas sob forma alterada em relação àquela nativa, facilitando uma etapa acessória de celulólise enzimática produtiva, com vistas à obtenção de D-glucose.

C) Comparativamente às hidrólises ou pré-tratamentos clássicos (clorídrico ou sulfúrico), menor efeito destrutivo das pentoses é observado com o pré-tratamento fosfórico, como medido pela produção de furfural.

D) Diferentemente dos agentes hidrolíticos acima mencionados, que requerem eliminação prévia na etapa posterior de fermenta-



ção do hidrolisado, o ácido fosfórico, mediante simples neutralização com amônia, pode integrar diretamente o mosto a ser fermentado, satisfeita que fica, a exigência de componentes mínimos para a fermentação: fonte de carbono (pentoses e hexoses), fonte de fósforo e nitrogênio (fosfato de amônio, resultante da neutralização).

E) A suplementação dos hidrolisados fosfóricos neutralizados mediante quantidades limitadas de sais de Vogel, sustenta o crescimento de cepas de leveduras contemporaneamente recomendadas para a bioconversão de pentoses, tais como: Pachysolen tannophilus, Candida shehatae e Pichia stipitis, obtendo-se satisfatória conversão dos açúcares livres a biomassa ou proteína microbiana.

Tais hidrolisados, após tratamentos clarificadores, para a pequena porcentagem de co-produtos gerados na hidrólise (furfural, fragmentos fenólicos), podem ser fermentados pelas leveduras até etanol, atingindo a conversão de até 0,30g/g de pentose consumida, quando hidrolisado de cana, tratado com o agente clarificador que se mostrou mais eficiente, o carvão ativo, foi fermentado pela levedura Candida shehatae 1.

O reforço da fonte nitrogenada com extrato de levedura (0,1g%) melhora a habilidade fermentativa das tres leveduras, embora se tenha logrado crescimento de Pachysolen tannophilus e produção de etanol, mesmo ao uso de hidrolisado fosfórico de Pinus, simplesmente neutralizado.

Como a bioconversão de pentoses a por extensão da fração hemicelulósica de fitobiomassa agro-florestal, é um desafio tecnológico próprio da década de 80 e em vista de obstáculos, tais como a catabolização do etanol formado, qualidade da biomassa microbiana, co-geração de princípios inibitórios, ainda persistirem como desafios abertos até para a comunidade científica internacionalmente mais especializada, cujo maior desenvolvimento experimental se faz ao uso de D-xilose p.a., o aprofundamento das bases ora estabelecidas para o pré-tratamento fosfórico, surge como alternativa válida.

## INTRODUÇÃO

### 1. O PROBLEMA ENERGÉTICO MUNDIAL

Logo após a IIª Guerra Mundial, suprimentos abundantes de alimentos e energia, constituíam parte importante e sem precedentes do crescimento econômico.

Contudo, entre 1973-1974 o embargo do petróleo pela OPEP, conturbou essa situação favorável, atingindo um ponto crítico, do qual não há retorno visível (120).

Nos últimos dez anos, o petróleo respondeu por mais de 45% da energia primária consumida no Brasil, dos quais 85% corresponderam a importações do produto. Assim, quando os preços internacionais do óleo cru quadruplicaram entre 1973-1974, o impacto sobre a economia nacional já foi bastante profundo.

Porém, foi com o novo salto dos preços entre 1979 - 1980, que ficou evidente que a era do produto, como fonte energética barata e abundante, estava definitivamente encerrada (112).

Em vista dessa conjuntura, o Brasil lançou-se à tarefa de conservar energia e reduzir o consumo e a importação de petróleo, substituindo-o por formas e fontes alternativas de energia.

Para isso, uma das grandes vantagens do Brasil é a possibilidade que tem, como país tropical e extenso, com seus 8.511.965 Km<sup>2</sup>, além de suas excelentes condições edafo-climáticas, de produzir combustíveis renováveis derivados de biomassas vegetais (85).

Para se ter uma idéia do potencial da fotossíntese ao nível do Planeta, calcula-se que as plantas fixam aproximadamente 40 bilhões de toneladas de carbono por ano, quantidade

equivalente a cerca de dez vezes o carbono contido no carvão e no petróleo consumidos anualmente no mundo ( 18 ).

O aproveitamento desta biomassa como fonte de energia, está entretanto limitado, pela inexistência de uma doutrina técnico-científica para o seu emprego em larga escala ( 18 ).

Isto decorre do simples fato de que, de um modo geral, os países industrializados se situam em zonas de clima temperado e, em sua maioria, não possuem grandes extensões territoriais adequadas às plantações de espécies vegetais apropriadas à produção de energia. Portanto, é compreensível que esses países não tenham nenhum interesse em desenvolver, sistematicamente, os fundamentos científico-tecnológicos para a criação de uma "engenharia de biomassas como fonte de energia" , pois com isto estariam dando a autonomia técnica e energética a países que hoje se constituem em mercados assegurados para suas exportações de bens e equipamentos, desenvolvidos com base em tecnologias ligadas ao petróleo ( 18 ).

A demanda corrente por combustíveis líquidos levou as autoridades brasileiras a criarem o "PROGRAMA BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE ÁLCOOL" (Proálcool) através do decreto nº 76593 de 14/11/1975, planejando a gradual substituição de derivados de petróleo por álcool produzido da biomassa (137).

O Programa espera alcançar uma produção anual de 70 bilhões de litros de álcool até o ano 2000 ( 4 ).

Ainda que existam múltiplas aplicações para o álcool como combustível, o Proálcool no início, deu como prioritária a gradual substituição da gasolina pelo álcool, prevendo-se que a mistura poderá chegar a 50% até o ano de 1990 ( 4 ).

É bom lembrar que o Brasil fez a tentativa política com a decisão de prosseguir com um plano maior, quando os preços do álcool eram, pelo menos, duas vezes mais elevados do que os preços mundiais da gasolina. Como os preços mundiais do petróleo aumentaram rapidamente, os índices de expansão para a produção de álcool no Brasil avançaram significativamente e surgiu a decisão de fabricar novos veículos movidos somente a álcool (120).

Por seu maior rendimento, a cana de açúcar é a cultura que recebe a maior atenção do Proálcool. A cana, entretanto, é produzida em terras agrícolas de excelente qualidade, e a expansão da área cultivada com cana competirá com as culturas tradicionais de alimentos e produtos exportáveis, como o café e a soja (120).

O próprio governo admite que, no ano 2000, a expansão do cultivo da cana desviará a produção de alimentos para terras menos nobres, com declínio da produtividade, aumento do custo de produção e até mesmo afetando a produção total de alimentos em nosso país (85 ).

Culturas alternativas como a mandioca e o sorgo sacarino, que tem uma adaptação regional mais ampla e podem ser produzidas em terras inferiores e mesmo semi-áridas, estão sendo pesquisadas e podem até eventualmente ser mais importantes do que a cana de açúcar como fonte de álcool (120).

Particularmente o sorgo sacarino (Sorghum bicolor) pela sua alta produtividade (3700 a 5600 l/ha/ano), sua adaptabilidade a condições diversas de clima e solo, reduzida necessidade de água e fertilizantes nitrogenados, é uma alternativa bastante viável para a produção de etanol, uma vez que reduz a competição com produtos alimentares exportáveis em áreas de terras de melhor qualidade (56 ).

Além de uma relação favorável de auto-suficiência agrícola, o Brasil possui grandes extensões de terras ainda não exploradas e o suprimento energético industrial poderá ser garantido por um sistema de produção de florestas de maneira contínua com espécies de rápido crescimento, o que felizmente vem ocorrendo desde 1967, após a criação dos incentivos fiscais (115).

Hoje no Brasil, quando se pensa na implantação de florestas, com vistas à produção de biomassa para fins energéticos, prevê-se a utilização de espécies do gênero Eucalyptus, Pinus, Acacia e Mimosa scabrella (72 ), sendo que as plantações de eucalipto estão sendo feitas principalmente com o obje

tivo, de produzir através de processos de pirólise (139), carvão vegetal para os planos de expansão da siderurgia ( 4 ).

Existem aproximadamente 45 milhões de hectares cultivados no Brasil. A substituição completa do petróleo importado pelo álcool nos níveis normais de consumo, exigirá cerca de 16 milhões de hectares de terras cultivadas (120).

Por isso, os produtos e sub-produtos desta atividade de reflorestamento, da intensa atividade agrícola que caracteriza a economia brasileira e das usinas açucareiras e alcooleiras, se tornaram fontes de pesquisa objetivando um amplo aproveitamento.

A cana de açúcar presta-se bem à exemplificação: sabendo-se que uma tonelada de cana produz em média, 67 litros de álcool, 300 Kg de bagaço e 870 litros de vinhoto e que durante o ano de 1985, o Brasil produziu 10,7 bilhões de litros de álcool, depara-se com a espantosa cifra de bagaço formado como biomassa residual aproveitável, em quantidade que excede a sacarose, produto principal visado. Mais ainda, do ponto de vista de composição química, o conteúdo energético da sobra efetivamente suplanta o do produto primário ( 18 ).

Das 45 milhões de toneladas de bagaço formadas durante o ano de 1985, aproximadamente 50% foram queimadas em caldeiras para gerar vapor que fornece energia para o engenho e as instalações de fermentação (calor de combustão=10.000 Kcal/Kg) (141) e as 22,5 milhões de toneladas excedentes poderiam ser transformadas em combustível líquido, desde que processadas convenientemente.

Torna-se então altamente desejável para o Brasil, a qualificação de recursos humanos e capacitação tecnológica nos métodos de conversão química e bioconversão de biomassas para fins energéticos. Idealmente este empenho deveria conduzir ao desenvolvimento de tecnologia nacional própria, obedecendo-se os nossos interesses, peculiaridades e necessidades.

Durante o período previsto para uma definição do problema do petróleo (antes de 1990), as únicas alternativas que

poderão prover quantidades significativas de combustíveis líquidos, são o álcool de cana de açúcar e de amido. Óleo de xisto, carvão e álcool de materiais celulósicos prometem fornecer maiores quantidades de energia do que pode ser obtida de amidos e produtos de açúcar, contudo nenhuma dessas fontes pode ser avaliada em qualquer quantidade, antes de 1990 (120).

Porém é improvável que a biomassa venha a transformar-se, a nível mundial, num substituto em grande escala, de derivados de petróleo. Entretanto, pode ser importantíssima para nações, como o Brasil, que procuram diminuir sua dependência do petróleo importado, desenvolvendo recursos próprios, desde que possuam solo e clima adequados à produção de biomassa em grande escala ( 4 ).

Segundo o Balanço Energético Nacional, publicado pelo Ministério das Minas e Energia, já em 1982, a contribuição das biomassas na estrutura de consumo de energia primária no Brasil, foi de 30,2%: sendo que a lenha participou com 19,7% , a cana de açúcar com 10,2% e os resíduos agrícolas com 0,3% ( 18 ).

Permanece o desafio - já que cana e seu bagaço são realidades em crescimento exponencial no Brasil - da competência nacional em desenvolver uma química e biotecnologia satisfatórias.

## 2. BIOMASSA

O termo "Biomassa" refere-se a todos os materiais produzidos através da fotossíntese pelas plantas e pode ser aplicado a todos os componentes que contém carbono, quer sejam obtidos de fontes primárias (resíduos agrícolas, árvores), quer de materiais processados (lixo, estrume) (113).

As biomassas obtidas a partir de vegetais de tão distinta natureza sob a ótica botânica (FIGURA 1), apresentam em comum, os elementos fundamentais da parede celular: celulose ,

REINO	Eukaryota		
SUB-REINO	Cormobionta		
DIVISÃO	Spermatophyta		
SUB-DIVISÃO	Coniferophytina GIMNOSPERMAS	Magnoliophytina ANGIOSPERMAS	
CLASSE	Pinatae	Magnoliatae DICOTILEDÔNEAS	Liliatae MONOCOTILEDÔNEAS
SUB-CLASSE	Coniferae	Rosidae	Liliidae
SUPER-ORDEM		Rosanae	Lilianaes
ORDEM	Pinales	Fabales	Poales
FAMÍLIA	Pinaceae	Mimosaceae	Gramineae
SUB-FAMÍLIA			Andropogonoideae
GÊNERO/ESPÉCIE	<u>Pinus taeda</u> *	<u>Mimosa</u> <u>scabrella</u> *	<u>Sorghum</u> * <u>Saccharum</u> <u>offininarum</u> *

FIGURA 1: Classificação botânica dos quatro modelos\* de fitobio-massa nativa ou residual, abordados neste trabalho de tese (142).

hemicelulose e lignina.

A CELULOSE é o material orgânico mais abundante na terra, compreendendo aproximadamente 50% de toda a biomassa (59). Nas plantas de madeira dura (Angiospermas) seu conteúdo oscila entre 40 - 55%, enquanto que as de madeira mole (Gimnospermas) possuem entre 45 - 50% de celulose (61).

Quimicamente pode ser definida como um polímero linear de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranoose, interligadas por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4), constituindo os resíduos de celobiose as unidades repetitivas na cadeia celulósica. O seu grau de polimerização é da ordem de 10.000 unidades por molécula (116).

É insolúvel em água e somente ácidos, álcalis, soluções salinas concentradas ou reagentes complexos é que podem entumescer, dispersar ou até mesmo dissolver sua estrutura altamente organizada (59).

As fibras vegetais apresentam em sua estrutura, uma fina membrana externa, a parede primária, que envolve a espessa parede secundária. Esta usualmente é constituída por três camadas, designadas respectivamente de  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ . Envolvendo a fibra, encontra-se a altamente lignificada lamela média, com 1 - 2  $\mu$  de espessura. A camada  $S_2$  apesar de apresentar espessura variável, é sempre a camada mais grossa da parede celular (23, 29, 48).

As camadas de celulose na camada  $S_1$  são depositadas na forma de hélice em relação ao eixo da fibra; na camada  $S_2$  se depositam na forma de zonas concêntricas cujo número tem sido relacionado à idade da fibra (29), enquanto que na camada interna  $S_3$  as moléculas de celulose se depositam perpendicularmente a  $S_2$  (48).

As longas moléculas de celulose se unem para constituir uma fibrila elementar ou protofibrila com cerca de 30 Å de espessura e 40 Å de largura. O agregado destas fibrilas recebe o nome de microfibrilas, estruturas extremamente longas



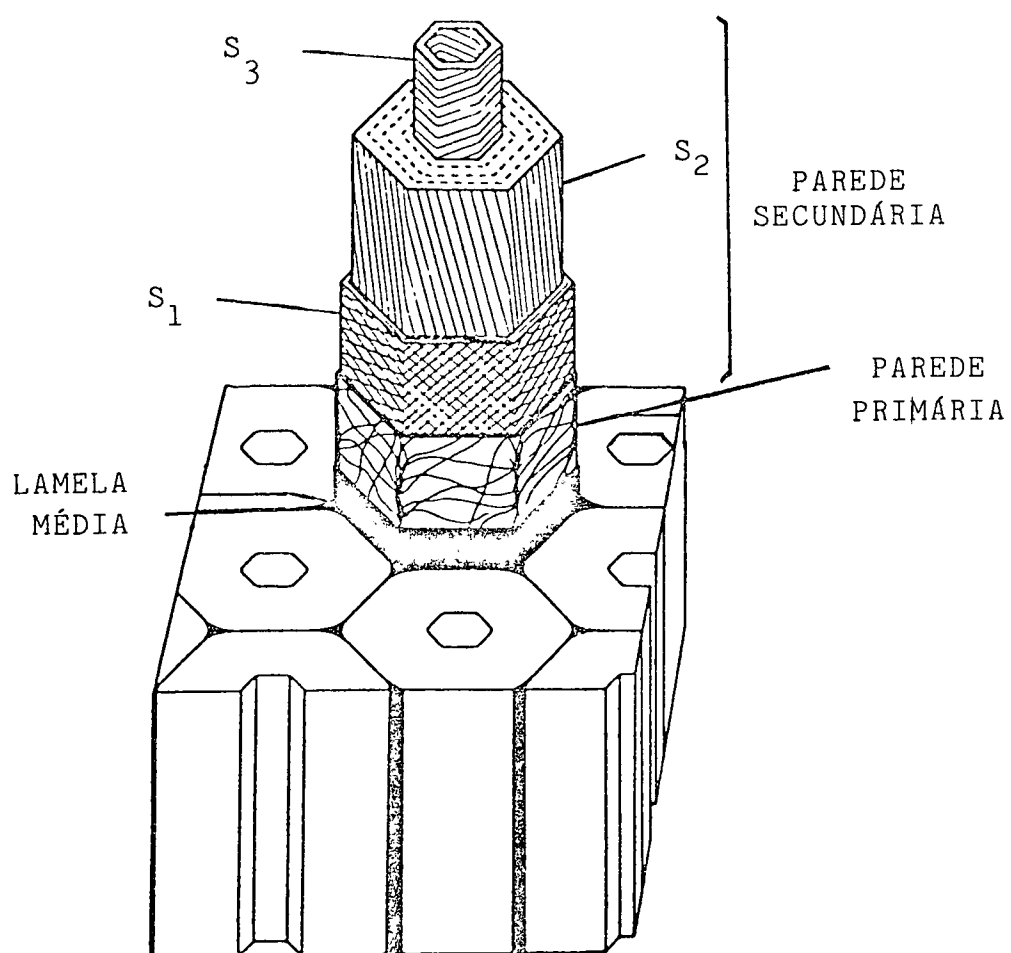


FIGURA 2: Estrutura da parede celular de uma fibra vegetal (147).

com um diâmetro de 250 Å ( 48 ).

Dentro de cada microfibrila, as cadeias lineares de celulose são unidas lateralmente por pontes de hidrogênio, inter e intramoleculares ( 59 ) e se associam em vários graus de paralelismo: regiões que possuem moléculas altamente ordenadas são denominadas de cristalinas, enquanto que aquelas que apresentam menor grau de ordenação são chamadas paracristalinas ou regiões amorfas ( 29 ).

Cerca de 50 - 90% da celulose, está localizada na porção cristalina. Estas duas regiões apresentam diferentes suscetibilidades à degradação enzimática, sendo que à medida que aumenta a cristalinidade, há paralelo aumento da resistência à hidrólise enzimática ( 48 ).

Os outros componentes celulares, hemicelulose e lignina, estão localizados entre as microfibrilas ( 48 ).

As HEMICELULOSES constituem um grupo de polissacarídeos de natureza polidiversa, polidispersa e polimolecular ( 123 ).

Não há uma definição que as caracterize universalmente, desde a criação do termo em 1891, por SCHULZE.

Segundo WILKIE ( 163 ):

"Hemiceluloses são polissacarídeos não celulósicos, encontrados nas partes aéreas e normalmente lignificadas de órgãos de plantas superiores, dos quais elas podem ser extraídas com soluções alcalinas após a remoção da lignina, e posteriormente, separadas por neutralização e precipitação com etanol ou acetona".

São polissacarídeos de baixo peso molecular, com um grau de polimerização não superior a 200 ( 61 ).

O termo hemicelulose é também aplicado a certos carboidratos de endospermas de cereais, denominados polissacarídeos não amídicos, descritos como gomas ou pentosanas de ce-

reais (147,163,164).

A maioria das hemiceluloses de plantas terrestres ocorrem, não como homoglicanas, mas como heteroglicanas, contendo diferentes tipos de unidades de hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico) e pentoses (D-xilose, L-arabinose) e em quantidades menores L-rhamnose, L-fucose e vários outros açúcares neutros O-metilados (147).

O conteúdo em hemiceluloses de diferentes plantas ou partes de uma mesma planta, são variáveis e inviáveis para comparação, devido aos diferentes procedimentos adotados com a finalidade de as isolar e quantificar (163). Além disso, há considerável variação na composição em açúcares, em função do tipo de tecido, estágio de crescimento, condições edáficas, condições fisiológicas e de estocagem (61,163).

As plantas de madeira dura possuem entre 24 - 40% de hemiceluloses, enquanto que as de madeira mole possuem de 25-35% (61,147).

Quando se comparamos polissacarídeos de diferentes vegetais, é a nível da fração hemicelulósica que a diferenciação estrutural se manifesta mais profundamente. Duas famílias principais de polissacarídeos distinguem respectivamente, dois grandes grupos de vegetais neste particular: pentosanas nas Angiospermas (cana de açúcar, bracatinga) e hexosanas nas Gimnospermas (coníferas).

Nas Angiospermas, a hemicelulose é predominantemente uma O-acetil-(4-O-metil-glucurono) xilana, acompanhada de pequenas proporções de uma glucomanana. A principal hemicelulose das Gimnospermas é uma O-acetil-galactoglucomanana em diferentes variações estruturais, além de menor quantidade de arabinó-(4-O-metil-glucurono) xilana (5,34,147,148).

Entre as hemiceluloses, as xilanas são as mais abundantes. Madeiras duras contêm de 20 - 25% de xilana, enquanto que madeiras moles contêm de 7 - 12% (82,147).

A estrutura geral das xilanas, em plantas superiores,

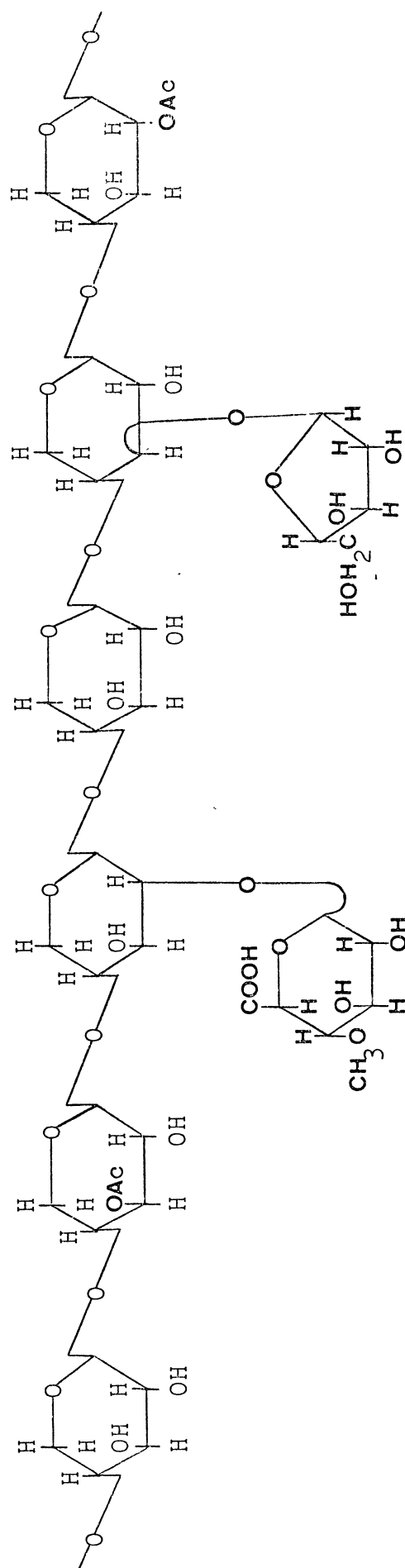


FIGURA 3: Estrutura de uma O-acetil-(4-O-metil-glucurono) xilana

compreende uma cadeia principal constituída de unidades de D-xilopiranoses unidas por ligações  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4). São moléculas com grau de polimerização entre 150 - 200. Ligadas à cadeia principal, estão cadeias singulares de uma unidade de ácido 4-O-metil-D-glucurônico, unidas através de ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2) às unidades de D-xilose da cadeia principal e unidades de L-arabinofuranose, unidas por ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  3) (142,147,148).

As primeiras são cadeias laterais características de Gimnospermas (Pinus) e Angiospermas dicotiledôneas (bracatin - ga), enquanto que as Angiospermas monocotiledôneas (gramíneas) apresentam como cadeias laterais, principalmente unidades de L-arabinofuranose, e em menores proporções, unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurônico ( 5 ).

Xilanas típicas de Gimnospermas, embora não sejam componentes hemicelulósicos majoritários, contém maiores proporções de unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurônico (15 - 20%) que as xilanas de Angiospermas (8 - 15%) ( 61,148).

Um importante grupo de xilanas, notadamente as 4-O-metil-glucuronoxilanas, que constituem 18 a 25% das madeiras duras, ocorrem na forma parcialmente acetilada. Algumas destas xilanas, podem conter de 7 a 9 grupos O-acetílicos por 10 unidades de D-xilose, num total de 3 - 5% de seu peso ( 82,147).

Estudos sobre a localização dos grupos O-acetílicos nas unidades de D-xilopiranoses, realizados por TIMMEL (147) demonstraram que há predominância de acetilação na posição C-2, C-3 e simultaneamente em C-2 e C-3. (Trabalhos recentes de REICHER e colaboradores (122) confirmam esta assertiva, usando heteroxilana de Mimosa scabrella).

As madeiras duras contém ainda de 3 - 5% de glucomananas constituídas por cadeias lineares de resíduos de D-glucopiranoses e D-manopiranoses, na proporção de 1:2, interligados através de ligações  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) e não contém galactose (148).

As glucomananas são as principais hemiceluloses das madeiras moles e constituem 50% do total de hemiceluloses de coníferas, onde ocorrem em estrita associação com a celulose ( 5 ).

Elas chegam a representar 11% do peso seco das coníferas (82).

As glucanas de madeiras moles também são parcialmente acetiladas, porém contém menos grupos O-acetílicos (1 - 1,5%) do que as glucuronoxilanas de madeiras duras (61, 82, 148). Como no caso das Angiospermas, também são constituídas de resí - duos de D-glucopirranose e D-manopirranose, interligados através de ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , podendo conter pequenas proporções de D-galactopirranose como grupos terminais não redutores (147). A glucomanana de Pinus taeda, apresenta uma relação man/glc = 2,7 com rotação específica =  $-20^\circ$  (148).

Em coníferas ocorrem ainda arabinogalactanos, repre - sentados por polissacarídeos altamente ramificados, com resí - duos de D-galactopirranose, interligados por ligações  $(1 \rightarrow 6)$  e  $(1 \rightarrow 3)$  (5). Por sua vez, o arabinogalactano isolado de Pinus taeda apresenta uma relação gal/ara = 11 com rotação específica =  $+16^\circ$  (148).

Para o isolamento destas hemiceluloses, principalmen - te aquelas de madeiras duras, a maior parte da lignina presente na lamela média, deverá ser previamente removida. Fazem exceção as hemiceluloses de gramíneas, que poderão ser extraídas sem este tratamento, sendo a hemicelulose delignificada posterior - mente (164).

O material obtido após a completa delignificação, é denominado holocelulose e compreende teoricamente a fração celu - lósica e hemicelulósica da madeira (123, 147, 163).

Na prática esta situação nunca é atingida, pois uma pequena proporção de lignina sempre permanece agregada à holoce - lulose. Para removê-la completamente, seriam necessárias condi - ções muito drásticas, que aumentariam a dissolução e consequen - te perda da fração hemicelulósica (147, 163).

Os principais agentes delignificantes usados são o gás cloro, o dióxido de cloro e o ácido peroxiacético. Os dois primeiros são gerados pelo uso do ácido acético a quente e clo - rito de sódio (147, 163).

A cloração da amostra por três a quatro vezes consecutivas, em banho de gelo durante cinco minutos, seguida de dupla

extração com solução de 2-aminoetanol a 3% em etanol, é suficiente para diminuir o conteúdo de lignina a 1% (147).

O uso repetido (8 - 10 vezes) de uma solução aquosa de dióxido de cloro tamponada com bicarbonato de sódio, à temperatura ambiente, seguido pela remoção da lignina oxidada por prolongada extração com metanol, conduz à obtenção de uma holocelulose menos modificada que o correspondente produto preparado com o gás cloro (147).

As hemiceluloses podem ser parcialmente extraídas de holoceluloses pelo emprego sucessivo de soluções alcalinas (KOH ou NaOH), diluídas inicialmente, e mais concentradas a posteriori (4 - 10%). O KOH é preferido porque o acetato de potássio formado durante a neutralização com ácido acético, é mais solúvel que o acetato de sódio, na fração alcoólica a ser usada para precipitar a fração hemicelulósica (136). Tratamentos de holoceluloses com concentrações alcalinas inicialmente baixas e depois mais altas, evitam a exposição desnecessária do material celulósico à álcali mais concentrado, do que aquela requerida para extraí-lo (164).

As hemiceluloses, quando extraídas dos tecidos vegetais, através de tratamento alcalino, podem ser separadas por neutralização e precipitação com etanol ou acetona, segundo o procedimento convencional estabelecido por O'DWYER (111). Nesta convenção, hemicelulose A é a fração insolúvel em água que é precipitada na neutralização do extrato alcalino com ácido acético até pH 4,5 - 5,0 e a hemicelulose B é isolada do sobrenadante anterior por precipitação com etanol numa concentração final de 70% (16, 164).

O material remanescente após o tratamento alcalino, recebe a denominação de  $\alpha$ -celulose, e compreende a celulose residual e materiais associados, além de pequena quantidade de hemiceluloses (163). A hemicelulose não extraída está ligada covalentemente à lignina remanescente ou adsorvida às microfibrilas de celulose (163).

A LIGNINA é o terceiro maior componente da parede ce-

lular e o maior constituinte da substância intercelular, responsável pela manutenção da integridade da coesa estrutura tridimensional das fibras vegetais ( 29 ).

Uma considerável parte da atividade fotossintética em plantas, é destinada à conversão do  $\text{CO}_2$  atmosférico em lignina. Ela constitui aproximadamente 40% da energia solar fixada em plantas. Não representa um composto definido e uniforme, mas é uma forma coletiva de substâncias, com propriedades químicas muito semelhantes, mas diferentes pesos moleculares, podendo atingir a faixa de mais de 100.000 daltons ( 75 ).

A lignina é um polímero altamente ramificado, constituído de unidades de fenil propano, interligadas por diferentes tipos de ligações (alquil-aril, alquil-alquil, aril-aril). A proporção relativa dos três álcoois cinâmílicos precursores, a saber, cumarílico, coniferílico e sinapílico, incorporados na lignina, varia não somente com a espécie vegetal, mas também com o tecido vegetal, idade, clima, luz solar, etc ( 75 ).

As madeiras moles apresentam entre 25 - 35% de lignina, ao passo que as madeiras duras, possuem um teor de lignina ligeiramente menor, de 18 - 25% ( 61 ).

A lamela média que separa as células vegetais umas das outras, contém 70% de lignina e constitui sobre a parede vegetal uma camada impermeável que impede, fora dos poros que a atravessam, o acesso aos agentes hidrolisantes ( 59, 116 ).

Além de preencher os espaços entre as fibrilas de celulose, a lignina está ligada química e fisicamente aos polisacarídeos ( 75 ). Na parede secundária, as ligninas e as hemiceluloses estão estreitamente associadas entre si e às fibrilas de celulose, por ligações covalentes, pontes de hidrogênio e forças de van der Waals ( 116 ).

A exata distribuição destes três componentes (celulose, hemicelulose e lignina) no interior da parede celular, pode ser vista na FIGURA 4, enquanto que seus teores em madeiras duras e madeiras moles, podem ser analisados comparativamente a partir da FIGURA 5 ( 48 ).



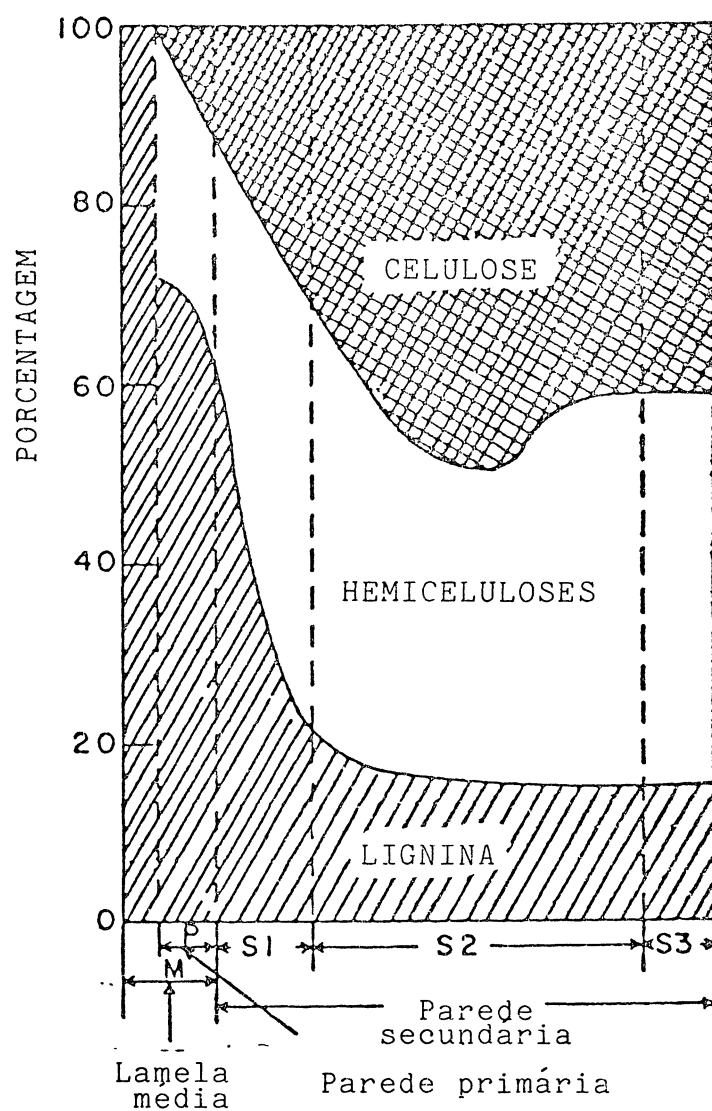


FIGURA 4: Distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina no interior da parede celular (48).

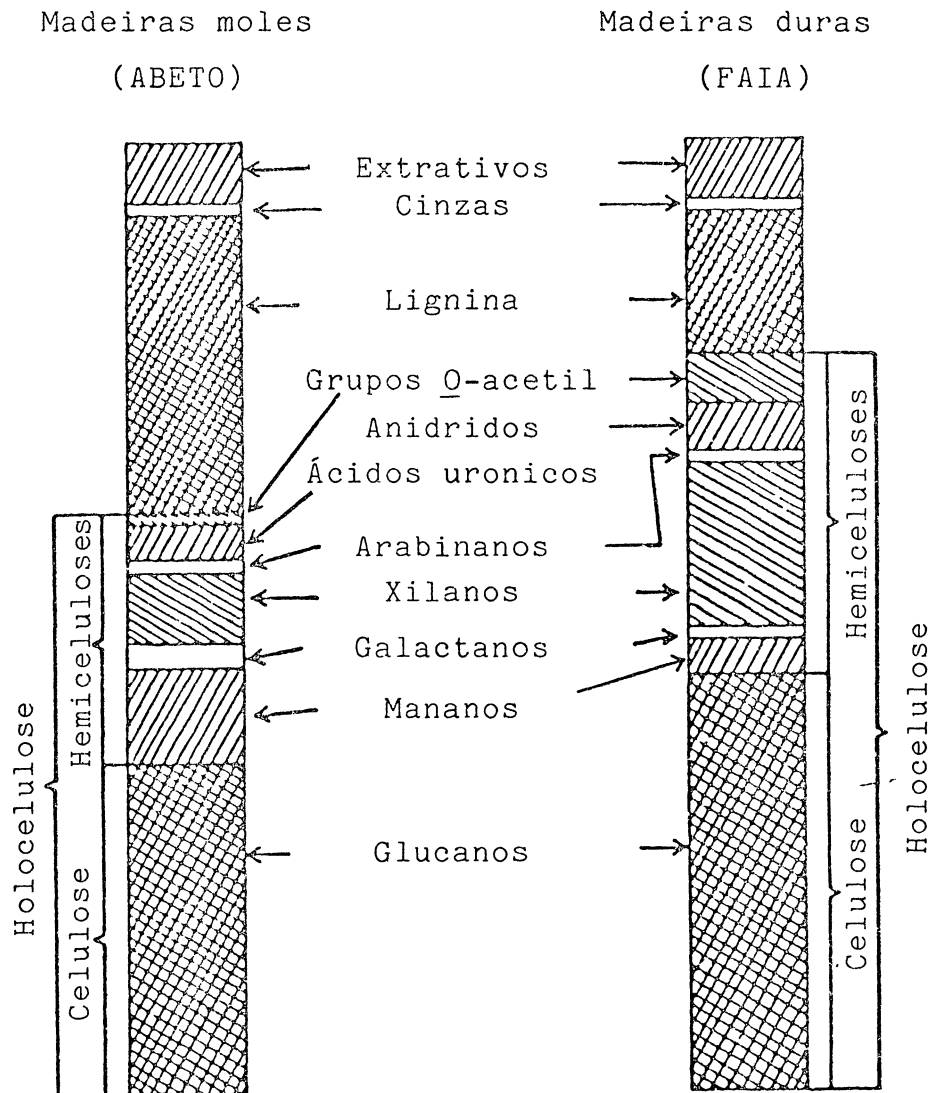


FIGURA 5: Teores dos diversos componentes celulares em madeiras duras e madeiras moles (48 ).

Além do arranjo molecular altamente ordenado da celulose nas regiões cristalinas das microfibrilas e a própria barreira física que a lignina constitui, as ligações lignina-carbohidrato formam blocos metabólicos que limitam grandemente a ação de celulasas e hemicelulasas. A menos que, a lignina seja depolimerizada, solubilizada ou removida, a celulose e hemicelulose não poderão ser facilmente hidrolisadas por ação destas enzimas ( 23, 29, 48 ).

Portanto, pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos serão necessários para a eficiente conversão da celulose em açúcares solúveis.

### 3. PRÉ-TRATAMENTOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Além de diminuir o teor de lignina e o grau de cristalinidade de materiais lignocelulósicos, diversos pré-tratamentos empregados tem a finalidade de diminuir o tamanho das partículas, para aumentar a superfície de contato com o agente hidrolítico, requisito primeiro para que qualquer reação se processe.

Estes pré-tratamentos são geralmente classificados em físicos, físico-químicos, químicos e biológicos, de acordo com o seu modo de ação sobre o substrato. Alguns processos são combinações de dois ou mais pré-tratamentos, aplicados em paralelo ou em sequência ( 48 ).

Os principais métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos são ( 37 , 48 ):

#### 3.1. FÍSICOS

Mecânicos: Moinho de bolas

Moinho de dois rolos

Moinho de martelos

Moinho de colóide

Moinho de vibração

Não mecânicos: Pirólise

Radiação de alta energia

Moagem úmida

### 3.2. FÍSICO-QUÍMICOS

Vapor a alta pressão

Explosão pelo vapor ("steam explosion")

Explosão pelo congelamento ("freeze explosion")

### 3.3. QUÍMICOS

Álcalis

NaOH

NH<sub>3</sub>

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

Ácidos

HCl concentrado e/ou diluído

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e/ou diluído

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado

Gases

ClO<sub>2</sub>

NO<sub>2</sub>

SO<sub>2</sub>

O<sub>3</sub>

Agentes oxidantes

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ácido peracético

Solventes de celulose (puros ou combinados a ácidos, álcalis ou sais)

Cadoxen

CMCS

## Extração por solventes

Glicerol

Etilenoglicol

Dioxano

Fenol

## 3.4. BIOLÓGICOS

Pleurotus ostreatus

Phanerochaete chrysosporium

Chaetomium globosum

Aureobasidium pullulans

## 3.1. PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICOS

Os pré-tratamentos físicos podem ser classificados em mecânicos e não mecânicos. Os tratamentos mecânicos se valem de forças físicas que subdividem o material lignocelulósico em finíssimas partículas, com uma grande relação superfície/volume, tornando-o mais acessível à hidrólise enzimática (48, 71). Paralelamente há redução da cristalinidade. Os não mecânicos, por sua vez, causam a decomposição destes materiais lignocelulósicos submetendo-os a forças externas outras que as mecânicas, como a irradiação, temperaturas, vapor a alta pressão (48).

### 3.1.1. Moinho de bolas

As forças cortantes e compressivas do moinho de bolas causam a redução da cristalinidade, um decréscimo do grau de polimerização e no tamanho das partículas e um aumento na densidade relativa. No entanto, apesar de ser um método muito eficiente para aumentar as taxas de hidrólise enzimática, os grandes tempos requeridos para a moagem dos materiais, conduzem a custos de processamento tão altos que não viabilizam o

seu emprego em larga escala ( 23 , 48 , 117 ).

### 3.1.2. Moinho de dois rolos

Consiste de dois rolos de ferro fundido temperado colocados horizontalmente, a uma distância regulável através de parafusos, por meio dos quais os resíduos são triturados por um determinado período de tempo. Causa a diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização e o seu efeito sobre a lignina não é conhecido.

Observou-se que o coeficiente de sedimentação das partículas obtidas através desta moagem, é menor do que daquelas obtidas no moinho de bolas, portanto propicia o uso de misturas reativas com alta concentração de sólidos, com consequente redução do volume do reator e dos custos de operação ( 48 , 117 ).

### 3.1.3. Moinho de martelos

Consiste de um rotor provido de uma série de martelos. Quando este motor gira, os martelos geram o impacto do material contra uma placa cortante, aumentando ligeiramente a suscetibilidade à hidrólise enzimática. Atualmente sabe-se que a moagem prolongada, reduz a suscetibilidade à celulase ( 48 , 71 ).

### 3.1.4. Moinho de colóide

Consiste de dois discos colocados próximos um do outro, que giram em sentidos opostos, enquanto o substrato passa através deles. Apesar de se obter incrementos na suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática, seus altos custos operacionais tornam o seu uso impraticável em larga escala ( 48 ).

### 3.1.5. Moinho de vibração

É semelhante ao moinho de bolas, com a diferença de que o moinho sofre ao invés de rotações, apenas vibrações. Por causar uma redução no tamanho das partículas, este tratamento leva a um aumento considerável na digestibilidade de materiais

lignocelulósicos, que pode ainda ser melhorada pelo aquecimento do substrato a 200°C, antes ou depois do tratamento (48, 71).

### 3.1.6. Moagem úmida

A moagem úmida isoladamente é menos eficiente do que a moagem a seco em moinho de bolas (23,117). No entanto, quando combinada à hidrólise simultânea, a eficiência do pré-tratamento pode ser incrementada enormemente, pois à medida que as moléculas reativas de celulose são removidas da superfície das microfibrilas, novos pontos para o ataque enzimático são formados pela ação combinada da moagem, resultando em uma gradativa destruição da estrutura cristalina da celulose. Deste modo, não somente não se verifica a queda drástica da velocidade de sacarificação que ocorre normalmente durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos, como também a sacarificação atinge valores mais elevados. A combinação da moagem em úmido com a sacarificação simultânea é do ponto de vista teórico, um método eficiente para aumentar tanto a velocidade quanto a intensidade de sacarificação (23,117).

### 3.1.7 Pirólise

Em temperaturas acima de 300°C, materiais celulósicos são degradados termicamente com produção de gases, líquidos (breu) e sólidos (carvão) como produtos primários, cujos teores e qualidade são dependentes dos parâmetros da reação, como: temperatura final, tempo de residência, tamanho das partículas, umidade, conteúdo em cinzas, presença ou não de  $O_2$  (139).

A temperaturas intermediárias, sob atmosfera inerte ou deficiente em  $O_2$ , facilmente recupera-se o breu e o carvão, pois limita-se as reações secundárias que estes poderiam sofrer (139).

A posterior hidrólise ácida suave da fração de breu, produz teores de açúcares redutores na faixa de 80 - 85%, um

valor equivalente a mais que 50% da celulose (48).

Na presença de  $O_2$ , as reações de depolimerização, oxidação e desidratação são aceleradas. A decomposição da celulose pode ser conseguida a temperaturas muito baixas, pela adição de um catalisador, como o  $ZnCl_2$  (48).

### 3.1.8. Radiação de alta energia

A irradiação da celulose resulta na degradação oxidativa das moléculas, desidrogenação e destruição das unidades de anidroglicose, gerando a quebra das cadeias celulósicas e formação de  $CO_2$ .

A radiação é muito eficiente para aumentar a área superficial devido à extensa despolimerização, mas não o é para diminuir a cristalinidade. Este tratamento é altamente seletivo, e é proporcional à dosagem total aplicada. Normalmente a despolimerização de carboidratos ocorre com radiações ionizantes em doses de  $10^6 - 10^8$  rads (37). A digestibilidade pode ainda ser aumentada pela prévia moagem do material, adição de nitratos ou usando a irradiação na presença de  $O_2$  (48).

Seu alto custo, tornam-o impraticável.

## 3.2. PRÉ-TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

### 3.2.1. Vapor a alta pressão

É um pré-tratamento aquoso no qual o substrato é submetido a vapor sob pressão (500 - 550psi), a temperaturas entre 175 - 225°C, sem adição de substâncias químicas e com uma atmosfera não oxidativa (11, 20, 48). Este tratamento causa a hidrólise dos grupamentos O-acetílicos presentes nas hemiceluloses, com formação de ácido acético, o qual mantém um pH ácido (na faixa de 3 - 4) que catalisa a hidrólise (auto-hidrólise) das hemiceluloses, resultando na sua solubilização no vapor condensado (11, 19, 37, 48, 148).

Este tipo de pré-tratamento fraciona seletivamente cada um dos três polímeros constituintes da lignocelulose, a sa-



ber: hemicelulose solúvel na fração aquosa, a lignina pode ser extraída do condensado pelo tratamento com álcali diluído ou álcool-água e a celulose permanece insolúvel (37).

### 3.2.2. Explosão pelo vapor ("steam explosion")

Quando a reação de auto-hidrólise anteriormente descrita é seguida de uma descompressão instantânea, o pré-tratamento é chamado explosão pelo vapor (11, 17, 23, 37, 117).

Com a descompressão, a água evapora rapidamente e as fibras da madeira tendem a desagregar-se, aumentando grandemente a superfície exposta à ação enzimática. Em adição, a umidade e a elevada temperatura empregada liberam ácidos que aumentam ainda mais a digestibilidade da celulose (32). Quando se incorpora  $N_2$  ao vapor, há uma ruptura maior das fibras do material explodido (17). As principais reações que ocorrem durante este tratamento são as hidrolíticas. Dentre os componentes da madeira, as pentosanas são as mais atingidas, as quais são amplamente solubilizadas em água a 250°C durante um minuto; metade da lignina torna-se solúvel em água-álcool após 55 segundos a 259°C e a celulose permanece quase que totalmente insolúvel, mas com um grau de polimerização muito menor (17).

Este tratamento preserva a alta qualidade da lignina e previne a sua repolimerização durante o processo de hidrólise posterior (75).

O processo também pode ser executado com a adição de  $CO_2$ ,  $SO_2$  ou álcali, antes ou durante o tratamento pelo vapor.

O uso do  $CO_2$ , particularmente para madeiras duras, aumenta a acidez durante o processo, facilitando a solubilização e remoção dos componentes hemicelulósicos, enquanto que o  $SO_2$  age, em madeiras duras, como um catalisador da hidrólise das ligações  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4) das glucomananas (48).

A explosão pelo vapor em condições alcalinas, denominada explosão alcalina (12g NaOH/100g do material lignocelulósico), produz um resíduo muito mais digerível pelas enzimas, do que a explosão pelo vapor isoladamente. Este aumento de digestibilidade é atribuído à dissolução das hemiceluloses e par

te da lignina, inchamento da celulose, saponificação das ligações éster intramoleculares e redução do grau de polimerização da celulose ( 37 ).

Apresenta como vantagem a não geração de resíduos poluidores químicos (117) e como desvantagem a parcial degradação de açúcares, principalmente as pentosanas, das quais mais que 60% são destruídas a 250°C por 2 minutos ( 17 , 20 , 32 ).

### 3.2.3. Explosão pelo congelamento

Para prevenir esta degradação, os materiais lignocelulósicos são colocados em contato com um líquido volátil, como a  $\text{NH}_3$ , sob pressão em temperaturas inferiores àquelas que degradam os açúcares. Após um determinado período de residência, o material é bruscamente descomprimido, causando a evaporação da  $\text{NH}_3$  e diminuição drástica da temperatura com congelamento da porção externa da fibra. Por sua vez, a  $\text{NH}_3$  no interior da fibra entra em ebulição, causando a sua explosão, com redução do tamanho das partículas e aumento da digestibilidade da celulose. Paralelamente há uma leve redução do conteúdo de lignina.

Este método de pré-tratamento tem potencial para comercialização, pois não requer equipamentos sofisticados, a operação pode ser conduzida à temperatura ambiente, a  $\text{NH}_3$  pode ser recuperada e a  $\text{NH}_3$  residual remanescente na fibra, pode servir como fonte de N para os microrganismos empregados no processo fermentativo subsequente ( 32 , 37 ).

### 3.3. PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS

São usados extensivamente para remover a lignina que envolve a celulose, bem como para destruir a sua estrutura cristalina. Apesar de serem eficientes no aumento da suscetibilidade da celulose, apresentam uma série de desvantagens: corrosão de equipamentos, custos elevados, devem ser recuperados para sua reutilização, exigindo para isso enormes quantidades de água, podem ser tóxicos ou inibitórios a sistemas biológicos, portanto devem ser completamente removidos do material ( 32 , 71 ).

### 3.3.1. Álcalis

Os tratamentos de resíduos celulósicos com NaOH diluído,  $\text{NH}_3$  líquida e sulfito de amônia, são há muito usados para aumentar a digestibilidade destes materiais, visando o seu posterior emprego como ração para ruminantes. Mais recentemente verificou-se que estes tratamentos causam um inchamento dos resíduos lignocelulósicos, aumento da sua área superficial, de créscimo do grau de polimerização e da cristalinidade, destruição das ligações lignina-carbohidrato e destruição da própria estrutura da lignina, com conseqüente aumento da sua suscetibilidade à degradação enzimática ( 48 ,117).

O NaOH tem sido o agente químico utilizado com maior frequência no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Ele atua, seja sobre a lignina, solubilizando-a em grande parte, seja sobre a parte cristalina da celulose, desagregando-a ( 49 ,117).

FAN e colaboradores ( 47 ) conseguiram diminuir em 56,5% o conteúdo de lignina de palha de trigo tratada com NaOH 1% (0,25N), autoclavada durante 2 horas a 129°C (2,57atm).

### 3.3.2. Ácidos

Os vários métodos de hidrólise ácida preconizados para a celulose, podem ser agrupados numa das seguintes categorias ( 70 ):

- A. Hidrólise com ácidos concentrados e baixas temperaturas, seguida de uma hidrólise diluída.
- B. Hidrólise com ácidos concentrados e baixas temperaturas, antecédida de uma hidrólise diluída.
- C. Hidrólise ácida diluída sem a separação dos produtos à medida que são formados.
- D. Hidrólise ácida diluída que remove continuamente os produtos formados.

O emprego de ácidos minerais concentrados, como o HCl e o  $H_2SO_4$ , na hidrólise da celulose é do conhecimento geral, pois é a base de processos industriais de sacarificação, largamente empregados por alguns países durante a IIª Guerra Mundial (48,117).

O uso do  $H_3PO_4$  xaroposo a 85%, numa temperatura de 2°C durante 2 horas, foi preconizado por WALSETH (156) para solubilizar a celulose. Como resultado obteve uma celulose amorfa e altamente reativa à degradação enzimática.

FARID e colaboradores (49) também usaram o  $H_3PO_4$  xaroposo, com o objetivo de aumentar a digestibilidade de bagaço de cana. Com o emprego de concentrações variáveis de 12,5-50% a 100°C durante 30 minutos, obtiveram com o ácido mais concentrado, um resíduo do qual apenas 12,5% foi sacarificado por ação das celulasas.

Menos conhecida é porém, a aplicação de ácidos minerais diluídos como pré-tratamento, com a finalidade de aumentar a suscetibilidade do material celulósico à hidrólise enzimática (48,156).

### 3.3.2.1. Hidrólise com ácidos concentrados e baixas temperaturas, seguida de hidrólise diluída

Pelo tratamento de bagaço de cana com  $H_2SO_4$  a 50% durante 15 minutos a 121°C, seguido da diluição do ácido a 1% e aquecimento a 121°C durante 15 minutos, HAN e CALLIHAN (70) obtiveram um rendimento em açúcar de 23%, rendimento baixo devido à degradação dos açúcares formados a furfural e ácido levulínico. Neste processo, o ácido concentrado hidrolisa inicialmente os polissacarídeos a oligossacarídeos, que são desdobrados a seus componentes monoméricos pelo emprego do ácido diluído (48).

### 3.3.2.2. Hidrólise com ácidos concentrados e baixas temperaturas, antecedida de uma pré-hidrólise com ácido diluído.

Neste procedimento os rendimentos são altos (80% ou mais dos açúcares disponíveis), porém tem o inconveniente do grande consumo de ácidos (166).

Este processo pode ser dividido em 3 etapas:

- a) O resíduo é colocado em contato com ácido diluído a 8% a 100°C durante 2 horas. Estas suaves condições fornecem teores estequiométricos de hemicelulose, mas não degradam seus açúcares monoméricos, nem a celulose cristalina.
- b) Em seguida, separa-se a solução hidrolisada, que é totalmente removida do resíduo por sucessivas lavagens do mesmo com água. O resíduo é submetido à centrifugação, da qual sai com 55% de umidade, sendo misturado com ácido diluído a 8%, com o qual fica em maceração por 2 horas, a baixas temperaturas, para que o ácido impregne a biomassa. Após nova centrifugação, seguida de secagem a 85°C seu teor de umidade passa a 10%. A secagem remove a água, mas não o ácido, portanto a fibra da celulose fica impregnada com ácido concentrado, que rompe as pontes de hidrogênio entre as cadeias adjacentes de celulose.
- c) Os sólidos secos impregnados com o ácido, são misturados com água e vapor a 140°C. A celulose pode ser hidrolisada a D-glucose em alguns minutos a baixas temperaturas, com formação mínima de sub-produtos (166).

### 3.3.2.3. Hidrólise com ácidos diluídos

O emprego de ácidos diluídos, apesar de não remover a lignina, aumenta a digestibilidade de materiais lignocelulósicos, porém quando associada ao uso de baixas temperaturas (95 - 120°C), a sacarificação não é completa a não ser que um passo de delignificação seja incluído (87).

Para hidrolisar eficientemente a celulose através do emprego de ácidos diluídos (1 - 2% em peso), são requeridas temperaturas na faixa de 240°C. Nestas condições, o ácido catalisa paralelamente a decomposição da D-glucose a hidroximetilfurfural e da D-xilose a furfural (87).

A alta temperatura empregada e o baixo pH, além de requerem equipamentos especiais, resistentes à corrosão, causam a degradação de alguns açúcares formados e tem baixo rendimento (55-75%), mas podem produzir potencialmente uma solução concentrada de açúcar (53,166).

GROHMAN e colaboradores, tratando palha de trigo com  $H_2SO_4$  a 0,5%, a temperaturas entre 90 a 160°C e diversos tempos de residência, verificaram que a decomposição dos açúcares parece ser mais afetada pela temperatura do que pelo tempo de residência, uma vez que 0,36% dos açúcares foram desidratados a 90°C - 275 minutos e 15% a 160°C - 10 minutos (65).

Esta degradação pode ser minimizada pelo aumento da temperatura e diminuição do tempo de residência, que podem ser atingidas pela remoção dos açúcares formados em um dos seguintes reatores:

a) Reator de fluxo retardado

É um processo contínuo através do qual se conseguem rendimentos de 55% do teórico. Trabalha a altas temperaturas (220 - 240°C) e pequenos tempos de residência (6 - 12 segundos), condições em que a hidrólise da celulose é mais rápida que a sua degradação (166).

b) Percolador

É um processo semi-contínuo, no qual o material é colocado no reator, que é preenchido com solução de ácido (principalmente o  $H_2SO_4$ ) a 0,5%. Esta solução é aquecida a 150°C e permanece no reator durante 30 minutos. Nestas condições a hemicelulose é hidrolisada, mas seus produtos e a celulose cristalina praticamente não são degradadas.

Após 30 minutos, quantidades iguais da solução ácida e de açúcar são respectivamente, colocadas e retiradas do reator. A temperatura da mistura que está entrando é elevada a 180°C para hidrolisar a celulose cristalina. Os sólidos remanescentes consistem de lignina e celulose cristalina não reativa e contém menos que 10% dos açúcares produzidos na hidrólise.

Apresenta altos rendimentos, mas produz soluções diluídas em virtude da constante remoção dos hidrolisados com o objetivo de evitar a sua degradação ( 53 ,166).

Apesar da similaridade química reinante entre a celulose e as hemiceluloses, a hidrólise ácida da hemicelulose requer condições muito mais suaves do que aquelas requeridas para a hidrólise da celulose. Portanto quando os processos anteriores são conduzidos em condições que favoreçam e otimizem a hidrólise da celulose, a maior parte da D-xilose é desidratada a furfural. A facilidade de hidrólise da hemicelulose a seus açúcares monoméricos, cria uma possibilidade de hidrolisar seletivamente esta fração ( 91 ).

Para atingir este objetivo, ACKERSON e colaboradores ( 1 ) propuseram um processo de hidrólise ácida em dois estágios: inicialmente diluída para hidrolisar as hemiceluloses, cujos componentes são removidos completamente do resíduo por sucessivas lavagens, o qual é então tratado com ácido concentrado para hidrolisar a celulose. Apresenta rendimentos maiores que a hidrólise em fase única, porém a grande quantidade de ácidos empregada, exige a sua recuperação.

A hidrólise da hemicelulose é máxima com concentrações de  $H_2SO_4$  a 18% (1,83M), a 100°C durante 50 minutos, enquanto que a da celulose requer ácido a 85% (8,64M), a 100°C durante 10 minutos, dando lugar a um rendimento de 95%.

Como a hemicelulose está intimamente relacionada à celulose, a remoção daquela resulta numa celulose mais suscetível ao ataque das enzimas. Portanto, o uso da hidrólise ácida diluída para remover seletivamente as pentosanas, aumenta o potencial de aproveitamento da biomassa, ao mesmo tempo em que constitui um eficiente método de pré-tratamento ( 66 , 67 , 87 , 91 ).

KNAPPERT e colaboradores ( 87 ) tratando madeira de álamo com  $H_2SO_4$  a 1%, 220°C durante 12 segundos, obtiveram 48% de transformação da hemicelulose, enquanto que 90% da celulose remanescente quando tratada com celulase, foi transformada em D-glucose.

Da mesma maneira, ALLEN e colaboradores ( 3 ) verifi-

caram que a hidrólise de uma mistura de madeiras duras a 10% (p/v) em  $H_2SO_4$  a 1,6% (p/p) a 200°C durante 7,5 segundos, deu origem a um resíduo lignocelulósico suscetível à degradação enzimática, com transformação de 95% a D-glucose, quando incubada com celulase, numa concentração de sólidos de 2 - 6% e relação enzima : sólidos de 16,7 UI/g .

A hidrólise ácida diluída de materiais lignocelulósicos, por facultar a hidrólise seletiva da fração hemicelulósica, que representa em média 25 - 35% destes (61,147), dando origem a uma lignocelulose residual altamente suscetível à degradação enzimática pela celulase, poderá tornar o processo global de conversão microbiana de biomassas com vistas à obtenção de combustíveis líquidos, promissor e economicamente viável, graças à possibilidade de utilização dos açúcares resultantes, pentoses e hexoses respectivamente, através de leveduras apropriadas.

É nesta linha estratégica que repousa o método inovador ( $H_3PO_4$  diluído) desenvolvido nesta tese.

### 3.3.3. Gases

Os pré-tratamentos com gases tem a vantagem de facilitar a penetração uniforme no substrato. Por outro lado, as condições de trabalho, bem como a sua recuperação para posterior reuso, são mais difíceis e problemáticas.

3.3.3.1. Dióxido de cloro: é um eficiente agente solubilizador de lignina, com subsequente aumento na digestibilidade do material (48,147,163).

3.3.3.2. Óxidos de nitrogênio: o tratamento de 100g de palha de trigo com 5g de  $NO$  e 6g de  $O_2$ , durante 24 horas à 25°C, levou a um teor de D-xilose equivalente a 69% do conteúdo de xilana originalmente presente na palha. Neste tratamento há formação de  $NO_2$  que reage com a água formando  $HNO_3$ , que oxida a celulose, a hemicelulose e degrada a lignina (48).



3.3.3.3. Dióxido de enxôfre: neste processo, mistura-se  $\text{SO}_2$  gasoso com materiais lignocelulósicos úmidos, a  $120^\circ\text{C}$  por 2-3 horas. Este tratamento rompe as ligações lignina-carbohidrato e depolimeriza a lignina, causando a conversão de 70-85% dos carbohidratos presentes, em açúcares livres ( 48 ).

3.3.3.4. Ozônio: é um agente que degrada a lignina, sem produção paralela de excessiva quantidade de poluentes, com custo menor que o apresentado pela explosão pelo vapor. O ozônio ataca preferencialmente a lignina e as hemiceluloses, e a sua ação sobre a associação celulose-hemicelulose-lignina, leva a um drástico aumento na digestibilidade da celulose residual ( 37 , 48 ). O ozônio ataca também os anéis aromáticos da lignina, do que podem resultar valiosos sub-produtos ( 37 ).

#### 3.3.4. Agentes oxidantes

Penetram na celulose, oxidando-a e causando modificação da sua estrutura. Alguns deles, tem a capacidade de interagir tanto com a porção cristalina, como com a região amorfa da celulose ( 48 ).

Os principais agentes oxidantes para a celulose são:

- Clorito de sódio
- Bromato de potássio
- Iodato de potássio
- Permanganato de potássio
- Metabissulfito de potássio
- Perclorato de potássio
- Hipoclorito de sódio
- Peróxido de hidrogênio
- Dióxido de nitrogênio
- Dióxido de cloro
- Dióxido de enxôfre
- Ozônio

FAN e colaboradores ( 47 ) obtiveram um aumento de 10 vezes na digestibilidade de palha de trigo, tratada com ácido peracético (anidrido acético e  $H_2O_2$  35% 1:1), em função de uma taxa de 76,2% de delignificação.

### 3.3.5. Solventes de celulose

Este pré-tratamento resulta na dissolução da celulose e hemicelulose, com redução da cristalinidade e ruptura da matriz da lignina. Desta solução, a celulose pode ser reprecipitada pela adição de água ou metanol ( 37, 48 ).

Os solventes de celulose podem ser divididos em quatro categorias ( 37 ):

3.3.5.1. Ácidos minerais fortes:  $HCl$ ,  $H_2SO_4$  e  $H_3PO_4$ .

3.3.5.2. Solventes à base de amônia: etilenodiamino, etilamina, amônia, hidrazina, bases quaternárias de amônia como o benziltrimetilhidróxiamônia.

3.3.5.3. Solventes apróticos: DMSO, dimetilformamida,  $N_2O_4$  e óxidos de enxôfre.

3.3.5.4. Complexos metálicos: Cadoxen (óxido de cádmio em etilenodiamino aquoso), Cuoxan (complexo amoniacal de hidróxido de cobre) e CMCS (tartarato de sódio,  $FeCl_3$ ,  $NaOH$  e  $NaSO_3$ )

De todos estes solventes de celulose, os que se mostram mais promissores são aqueles que formam ligas, via complexos metálicos. Neste grupo, o solvente particularmente eficaz é o CMCS (Chelating Metal Caustic Sweeling), que além de apresentar baixos custos, não é tóxico, é recuperável e o tratamento é conduzido à temperatura ambiente. O solvente transforma a celulose nativa I em celulose II, forma altamente suscetível à degradação enzimática. ( 37 , 48 ).

O CMCS é um agente inchador e descrystalinizador de celulose mais potente que o  $NaOH$  isoladamente ( 37 ).

DETROY e colaboradores ( 42 ) demonstraram que o etilenodiamino apesar de muito corrosivo, é um potente agente de

cristalinizador de celulose, ao obter 60% de conversão da mesma a D-glucose, ao tratar palha de trigo com etilenodiamino a 28% durante 8 horas a 25°C.

### 3.3.6. Extração por solventes ("organosolv")

Envolve o tratamento de materiais lignocelulósicos com um solvente aquoso na presença de um catalisador. Neste processo, a hidrólise de hemiceluloses e extração da lignina, ocorrem simultaneamente ( 75 ).

O catalisador e a água hidrolisam as ligações ligni-na-lignina e carbohidrato-lignina e o solvente cria um ambiente organofílico, no qual se dissolve a lignina.

Os solventes mais usados são: álcoois (metanol, etanol, n-butanol), glicerol, etilenoglicol, dioxano e fenol. Os catalisadores são normalmente os ácidos de Lewis, como o  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ . Os ácidos orgânicos liberados durante o processo aceleram a delignificação e são responsáveis pela paralela solubilização de hemiceluloses. O processo é normalmente conduzido a altas temperaturas (e pressões), produzindo um substrato residual celulósico altamente degradável por enzimas e microrganismos ( 23 , 37 , 48 ).

O etilenoglicol ao lado do ácido peracético, são os dois agentes delignificadores mais eficientes, segundo FAN e colaboradores ( 47 ). Pelo tratamento de 48 gramas de palha de trigo com 600ml de etilenoglicol e 13ml de HCl concentrado, a 129°C (2,57 atm) durante 1 hora, obtiveram uma redução de 83,8% no conteúdo de lignina. Comparando-se com o método de explosão pelo vapor, este tratamento consegue uma delignificação mais intensa e mais seletiva, devido provavelmente à supressão da hidrólise das hemiceluloses pelos solventes e à dissolução da lignina durante o processo de hidrólise que dificulta a sua condensação ( 75 ).

### 3.3.7. Agentes inchadores

São fortes solventes eletrofílicos e podem ser divididos em duas categorias: intercristalinos e intracristalinos.

Na primeira, podemos citar a água que pode penetrar e degradar somente a porção amorfa da celulose. O segundo tipo de agentes inchadores, requer um reagente químico capaz de quebrar as pontes de hidrogênio da celulose e afetam tanto as porções amorfas como as cristalinas da mesma.

Como resultado da ação dos agentes intracristalinos, há mudanças na estrutura celular e na cristalinidade, que produzem um aumento na reatividade. Além de apresentar um menor acréscimo na suscetibilidade à degradação pela celulase do que o tratamento por solventes, ainda apresenta o inconveniente do alto consumo de reagentes, que limitam grandemente a sua aplicação em larga escala (23, 48).

Entre estes inchadores de celulose, temos (48):

NaOH

$H_2SO_4$

$H_3PO_4$

$NO_2$  em dimetilsulfóxido

$ZnCl_2$

Zincato de sódio

Benziltrimetilhidróxiamônia

### 3.4. PRÉ-TRATAMENTOS BIOLÓGICOS

Os pré-tratamentos biológicos utilizam microrganismos apodrecedores de madeira, que podem degradar isoladamente ou em paralelo, a celulose, as hemiceluloses e a lignina.

Entre estes, encontramos quatro categorias de fungos:

#### 3.4.1. Fungos da podridão marrom ("brown rot fungi")

Pertencem à sub-divisão dos Basidiomicetos e degradam principalmente os polissacarídeos das madeiras moles, tornando as quebradiças e de coloração marrom.

Exemplos: Poria placenta  
Lentinus lepideus  
Gloeophyllum trabea  
Coniophora puteana  
Pleurotus ostreatus  
Phaeolus schweinitzii

### 3.4.2. Fungos da podridão branca ("white rot fungi")

Também são Basidiomicetos e degradam tanto a lignina, como os polissacarídeos, principalmente de madeiras duras. A madeira degradada é macia e de coloração branca.

Exemplos: Phanerochaete chrysosporium  
Stereum sanguinolentum  
Fomes annosus  
Peniophora gigantea  
Polyporus versicolor  
Ganoderma applanatum

### 3.4.3. Fungos da podridão macia ("soft rot fungi")

Compreendem fungos pertencentes aos Ascomicetos e Fungos Imperfeitos, capazes de degradar polissacarídeos e lignina de madeiras duras e moles.

Exemplos: Chaetomium globosum  
Phialophora fastigiata  
Thielavia terrestris  
Papulospora sp  
Paecilomyces sp

### 3.4.4. Fungos do tingimento azulado ("blue stain fungi")

Também são Ascomicetos ou Fungos Imperfeitos, que vivem em células parenquimáticas de madeiras moles, às custas da degradação de polissacarídeos e proteínas residuais.

Seu maior dano à madeira é a sua descoloração nativa, tingindo-a de azul ou preto, em consequência do material depositado nos vacúolos no interior das hifas do fungo.

Exemplo: Aureobasidium pullulans

A degradação de madeiras por bactérias ocorre de maneira muito lenta quando comparada ao ataque fúngico. As bactérias formam colônias nas células parenquimáticas, degradando também polissacarídeos e lignina.

Exemplos: Bacillus polymyxa

Cellulomonas sp

Pseudomonas sp ( 50 )

A biodegradação da lignina é um processo oxidativo , que além de formar  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  como produtos finais, causa modificações ou bioalterações, como a demetilação e a oxidação parcial ( 30 , 48 , 75 )

O uso destes agentes delignificadores biológicos é promissor, porém a sua lentidão tem prevenido o uso em larga escala. Com auxílio da engenharia genética, usando a técnica do DNA recombinante, pode-se num futuro próximo, modificar estes microrganismos, acelerando o processo de crescimento e de delignificação, com possibilidade de sua aplicação como um efetivo método de pré-tratamento ( 37 , 48 ).

Como a lignina é a maior barreira para a hidrólise enzimática da celulose, exigindo altos custos para transformar os complexos lignocelulósicos a formas hidrolisadas, parece racional utilizar fontes de celulose com conteúdo de lignina reduzido. LINDEN e colaboradores ( 93 ) verificaram que durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, a lignificação ocorre após a biossíntese da celulose. Como a hidrólise da celulose é inversamente proporcional ao conteúdo de lignina, as partes vegetativas das plantas por apresentarem celulose com baixo teor de lignina, constituiriam por si só, um substrato mais acessível à degradação enzimática.

#### 4. FERMENTAÇÃO DE PENTOSE

A capacidade de catabolizar pentosanas é amplamente distribuída entre bactérias e fungos, mas este bioquimismo torna-se muito restrito quando etanol é proposto como principal produto fermentativo, a partir da unidade monomérica D-xilose.

Em vista das leveduras classicamente empregadas na fermentação etanólica de hexoses, como as espécies do gênero Saccharomyces, serem incapazes de promover a fermentação alcoólica de pentoses, os esforços tecnológicos iniciais neste sentido, exigiram o desenho experimental de uma fermentação em duas fases:

- a) Conversão da D-xilose em D-xilulose através da enzima comercialmente disponível, (glucose)-xilose-isomerase.
- b) Catabolização da pentulose resultante em etanol (60 ).

Mais recentemente, alguns grupos de pesquisadores iniciaram a exploração do bioquimismo fermentativo de algumas espécies de leveduras, capazes de promover a conversão direta da D-xilose a etanol e os resultados iniciais mostraram-se mais promissores com os gêneros Pachysolen (134), Pichia (39 ) e Candida (64 ,104).

##### 4.1. Fermentação indireta de pentoses com o emprego de xilose-isomerase

A isomerização da D-xilose a seu ceto-isômero, a D-xilulose, pode ser feita por via enzimática ou química.

A isomerização por via enzimática pode ser conseguida pelo emprego de uma preparação comercial de glucose isomerase E.C.5.3.1.5. (83 ) ou de células imobilizadas intactas de Bacillus sp (60 ,103), Streptomyces olivaceus e Actinoplanes missouriensis (61 ).

Quimicamente, a D-xilulose pode ser preparada pela isomerização da D-xilose catalisada por piridina (150,157,158) ou pelo método do aluminato de sódio, modificado por GONG e colaboradores (60).

O equilíbrio da reação de isomerização é desfavorável em relação à produção de D-xilulose (10 - 25%) e complica consideravelmente o processo (25).

Como a enzima não é inibida pelo etanol (25), o meio contendo a D-xilose residual, do qual a D-xilulose foi consumida durante o processo fermentativo, pode ser reciclado em sistema fechado sobre uma coluna externa de glucose isomerase (80), desde que através de aparelhos especiais se mantenham as leveduras no tanque de fermentação (25).

A fermentação da D-xilulose a etanol pelas leveduras se completa em 6 horas após cada reação de isomerização, e após 5 ciclos alternativos de isomerização/fermentação, 85% da D-xilose foi consumida, com rendimentos de etanol na faixa de 85% do teórico (25).

O uso sequenciado da isomerase e das leveduras, apesar de propiciar uma alta taxa de conversão de D-xilose a etanol, quando aplicado a sistemas de reatores imobilizados de enzimas e de levedura (25), apresenta como desvantagem os altos custos provenientes das repetidas reciclagens de soluções de açúcar relativamente diluídas (80).

Os principais microrganismos utilizados para proceder a fermentação da D-xilulose, são: Saccharomyces cerevisiae (60,157,158), Saccharomyces carlsbergensis (60,157,158), Schizosaccharomyces pombe (25,80,83,157,158), Saccharomyces uvarum (143) e Candida tropicalis (80).

Dentre estes, são particularmente eficientes a Candida tropicalis ATCC 1369 que produz concentrações de etanol mais altas e de xilitol mais baixas que aquelas obtidas quando a D-xilose foi usada como fonte de carbono (80,82) e o Schizosaccharomyces pombe ATCC 2473 que produziu mais etanol (2,3%) e menos xilitol (0,1%) a partir de D-xilulose que todas as outras leveduras testadas (80,82).



A taxa de conversão de D-xilose a D-xilulose pode ser aumentada pela adição de borato, obtendo-se em consequência, um aumento de 3 vezes na produção de etanol. Entretanto a utilização total da D-xilose não pode ser alcançada, porque a reação de isomerização está limitada a 80% na presença de borato (25).

Em função disto, a isomerização enzimática acoplada à fermentação, pelo contínuo deslocamento do produto intermediário, teoricamente seria o método ideal para aumentar os rendimentos em etanol a partir de D-xilulose (25). Entretanto não o é, porque a levedura e a glucose isomerase, apresentam diferentes pH e temperaturas ótimas (83).

Temperaturas maiores (70°C) e pH mais alcalinos (7,5) são ótimos para a isomerização, enquanto que temperaturas mais baixas (30°C) e pH também mais baixos (4 - 5) são requeridos para a fermentação. Além disso, a enzima é rapidamente desnaturada em pH = 4 (mas atua a mais baixas temperaturas), enquanto que a levedura não sobrevive em temperaturas acima de 35°C e valores de pH superiores a 6 causam a formação de grandes quantidades de xilitol e arabinitol (83).

Na prática, a manutenção de condições ótimas em cada um dos processos por requerer equipamentos controladores sofisticados, é muito difícil, por isso os reatores com a enzima e a levedura tendem a operar numa combinação de pH e temperaturas aproximadamente uniformes, intermediárias entre as condições ótimas dos dois biocatalisadores (pH = 6 e T = 30°C) (83).

Portanto o uso de leveduras termotolerantes como a Candida sp HT4, poderia minimizar os efeitos negativos do emprego destas condições sub-ótimas, uma vez que esta levedura apresenta temperatura ótima de fermentação entre 45-50°C (103).

Como as leveduras de cervejaria, do gênero Saccharomyces, tem a capacidade de fermentar a D-xilulose, estas poderiam produzir etanol a partir de D-xilose, desde que por técnicas de engenharia genética, nelas se incorporasse o gen que codifica a xilose isomerase (46,133).

SCHNEIDER e colaboradores (133) estão trabalhando neste sentido, cuja primeira estratégia envolveu o isolamento e caracterização de um plasmídeo de Escherichia coli que possuía o gen para a xilose isomerase. Passos seguintes requerem a introdução deste gen no DNA da levedura, para então obter a sua expressão.

UENG e colaboradores (153) já inseriram este plasmídeo de Escherichia coli contendo o gen para a xilose isomerase, em Schizosaccharomyces pombe. Este gen é muito estável nas células da levedura, as quais são capazes de fermentar diretamente a D-xilose a etanol (22).

O perfil de utilização da D-xilulose difere daquele da utilização da D-xilose. A maioria das leveduras utilizam facilmente a D-xilulose aeróbica e anaerobicamente (82).

A presença do  $O_2$  acelera o metabolismo da D-xilose, não tendo efeito significativo sobre a utilização da D-xilulose. Este efeito relacionado ao  $O_2$  (semelhante ao efeito Kluver) pode ser resultante de uma necessidade direta ou indireta de  $O_2$  para a entrada da D-xilose ou então para a atividade de uma enzima catabólica inicial (62).

Na FIGURA 6, observa-se que a transformação pelas leveduras, da D-xilose a xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses fosfato (VPP), pode ocorrer pela reação de oxidoredução da D-xilose a D-xilulose com formação de xilitol como intermediário, ou então, a D-xilose pode ser isomerizada diretamente a D-xilulose pela xilose isomerase (60).

A reação de oxidoredução parece ser a via comum porque normalmente aparece o xilitol como sub-produto metabólico destas leveduras, o que a elas falta é a enzima de isomerização (60, 61).

Esta mesma enzima não foi detectada também em culturas de Fusarium oxysporum (144).

As enzimas requeridas para o metabolismo da D-xilulose são constitutivas ou rapidamente induzidas em células previamente crescidas em D-glucose, de acordo com WANG e SCHNEIDER (60), pela inexistência de uma fase lag quando estas células foram i-

- 1 = Xilose redutase  
 2 = Xilitol desidrogenase  
 3 = Xilose isomerase  
 4 = Xiluloquinase

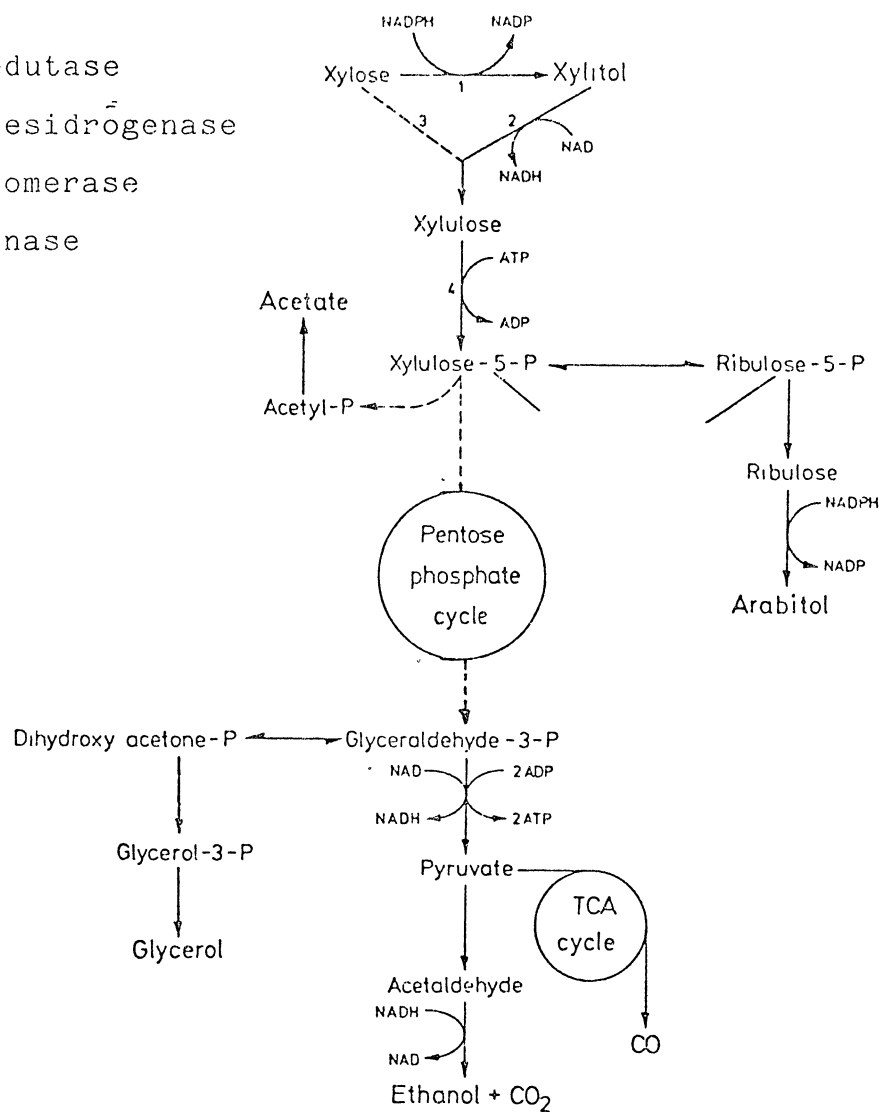


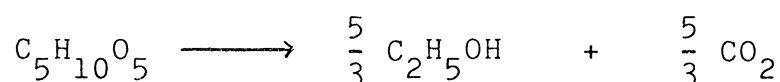
FIGURA 6: Metabolismo da D-xilose em leveduras (102).

noculadas em D-xilulose.

O mecanismo proposto para o catabolismo da D-xilulose é a fosforilação inicial a xilulose-5-fosfato, conversão desta a glucose-6-fosfato não oxidativamente pelas enzimas do "shunt" das pentoses, seguida pela conversão da glucose-6-fosfato a etanol, pela via de Embden-Meyerhof-Parnas.

Com base neste mecanismo, 6 moles de xilulose-5-fosfato produzem 5 moles de glucose-6-fosfato e cada mol de glucose-6-fosfato leva à formação de 2 moles de CO<sub>2</sub> e 2 moles de etanol (158).

Assumindo que cada mol de D-xilose pode ser convertido a D-xilulose e que cada mol de D-xilulose segue o mecanismo proposto acima, podemos escrever a seguinte equação geral:



Em função desta relação estequiométrica, o rendimento teórico de etanol corresponde a 0,51 grama/grama de pentose consumida (138).

#### 4.2. Fermentação direta das pentoses a etanol

As reações de conversão de pentoses por diferentes tipos de microrganismos podem ser visualizadas comparativamente na FIGURA 7.

##### 4.2.1. Conversão bacteriana de pentoses

Tal como as leveduras e os fungos filamentosos, também as bactérias convertem as pentoses a piruvato por uma combinação da via das pentoses fosfato e via de Embden-Meyerhof-Parnas (126).

O piruvato formado pode então ser convertido a etanol além de uma variedade de produtos finais, que incluem álcoois (butanol, isopropanol e 2,3 butanodiol), ácidos orgânicos (acético, butírico, fórmico e láctico), cetonas (acetona) e gases (H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) em função da bactéria utilizada.

Microrganismo	Estágios de conversão		
	1	2	3
	<u>D</u> -xilose ---> <u>D</u> -xilulose	<u>D</u> -xilulose-->Piruvato	Piruvato->Produtos finais
Bactérias	Isomerização	VPP + EMP	Etanol + Ácidos Etanol + 2,3 Butanodiol Etanol + Acetona + Butanol
Leveduras	Redox	VPP + EMP	Etanol
Fungos Filamentosos	Redox	VPP + EMP	Etanol + Ácido acético + Ácido láctico
VPP = Via das Pentoses Fosfato			EMP = Via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas)

FIGURA 7: Quadro comparativo do metabolismo de pentoses (D-xilose) em bactérias, leveduras e fungos filamentosos (165).

Entre estas, podemos citar a enterobactéria Klebsiella pneumoniae produtora de etanol e 2,3 butanodiol (74,128,129, 168,169) e o Clostridium acetobutylicum que produz uma mistura de solventes, que incluem acetona, butanol e etanol ( 7 , 86 , 116,128,155).

Zymomonas mobilis, uma eficiente produtora de etanol pela via de Entner-Doudoroff (a partir de sacarose), não o faz a partir de pentoses (124).

A produção bacteriana de etanol, apresenta restrições quando se pensa na sua projeção industrial, isto porque em função da grande variedade de produtos paralelos formados, a concentração relativa de etanol é baixa, quando comparada à fermentação etanólica de pentoses por leveduras, na qual se forma preponderantemente o etanol (165).

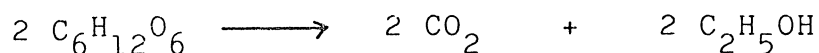
#### 4.2.2. Conversão de pentoses por fungos

Muitos fungos filamentosos são capazes de metabolizar hexoses a etanol, porém a capacidade de produzir quantidades significativas de etanol a partir de pentoses, está restrita a espécies do gênero Fusarium (109,126) e Paecilomyces (167).

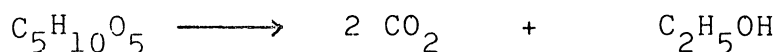
Em geral, esta taxa de produção de etanol a partir de D-xilose está muito aquém daquela observada em bactérias e leveduras, podendo ser melhorada pelo emprego de inóculo com alta concentração micelial (61 ).

A habilidade do Fusarium lini em fermentar pentoses é conhecida já há 60 anos (162). Quando cultivado em D-glucose ou D-xilose, Fusarium lini Bolley produz CO<sub>2</sub> e etanol, em proporções variáveis em função do carboidrato fermentado.

Em D-glucose, as quantidades de produtos formados obedecem a equação clássica da fermentação alcoólica pelas leveduras (Equação de Gay-Lussac):



Por outro lado, em D-xilose, a relação entre os produtos formados segue a reação:



Portanto este fungo quando cultivado em D-xilose, apresenta uma taxa de recuperação de C na faixa de 80% (57,162), sendo que o C "perdido" é acumulado no pool dos metabólitos intermediários (126).

Quando Fusarium lini é crescido em D-xilose, L-arabinose ou rhamnose, a D-xilose é utilizada mais eficientemente para a produção de etanol, enquanto que a L-arabinose é para crescimento (162).

O tempo de fermentação é muito longo, sendo necessários 40 dias para que se consuma totalmente uma solução de D-xilose a 4% (82). Os teores máximos de etanol são obtidos entre o 12 - 20º dia, após os quais o etanol é consumido pelo fungo (162). Concentrações de etanol entre 3 - 5% inibem completamente o seu crescimento (162).

Uma cultura mista de leveduras e Fusarium lini foi proposta por LOUGHRAN e colaboradores (97) para fermentar respectivamente, hexoses e pentoses presentes em hidrolisados ácidos de madeira, obtendo-se um aumento de 6 - 12% nos rendimentos de etanol.

GIBBS e colaboradores (57) demonstraram que "resting cells" de Fusarium lini Bolley quando crescidas anaerobicamente, fermentam um mol de D-xilose com produção de quantidades e quimoleculares de CO<sub>2</sub>, etanol e ácido acético, enquanto que células jovens em crescimento, produzem maiores níveis de etanol e CO<sub>2</sub> numa relação de 1:2 e somente traços de ácido acético.

Experimentos com C<sub>14</sub> radioativo demonstram que a xilulose-5-fosfato é cindida pela enzima fosfocetolase, entre o C-2 e o C-3, fragmentos então metabolizados pela VPP acoplada à via de EMP. O ácido acético é derivado do fragmento C-2 e o etanol e CO<sub>2</sub> do fragmento C-3, similarmente com o que ocorre com as bactérias lácticas (57).

O não aparecimento de quantidades apreciáveis de ácido acético em culturas jovens, sugere que as células em crescimento metabolizam o fragmento C-2 de uma maneira diferente da que o fazem as "resting cells", como por exemplo, a formação de lipídios ou então que o próprio ácido acético possa ser me-

tabolizado pelo fungo ( 57 ,126).

Este fungo apresenta como vantagem a relativamente alta tolerância a etanol (5 - 6%) e açúcares, além da sua atividade celulolítica e hemicelulolítica ( 9 ,119,145,165).

Mais recentemente, SUIHKO e ENARI (145) testaram 26 cepas pertencentes a 12 espécies do gênero Fusarium, com vistas à sua habilidade em fermentar uma solução de D-xilose a 5%. A cepa selecionada foi o Fusarium oxysporum VTT-D-80.134, que produziu 2,1% de etanol em 7 dias.

Também WU e colaboradores (167) isolaram um fungo, o Paecilomyces sp NF1, capaz de formar 0,40g etanol/g D-xilose consumida em 7 dias.

No entanto, este processo ainda é lento em consequência da reduzida taxa de crescimento destes fungos, exigindo muitas pesquisas para que se torne praticamente competitivo com a fermentação de pentoses por leveduras ( 61 ).

#### 4.2.3. Conversão de pentoses por leveduras

No que diz respeito à fermentação de pentoses por leveduras, BARNETT ( 10 ) investigou a utilização da D-xilose por 434 cepas capazes de processar a fermentação etanólica a partir de D-glucose e/ou sacarose, concluindo que apenas 214 utilizavam a D-xilose aerobicamente e nenhuma o fazia anaerobicamente.

Este "screening" desestimulou temporariamente as pesquisas referentes à fermentação de pentoses, entretanto mais recentemente, trabalhos promissores foram publicados, relatando a conversão da D-xilose a etanol em condições semi-aeróbicas pela levedura Pachysolen tannophilus ( 77,133,134 ) ; aeróbicas pelas leveduras Kluyveromyces marxianus (104), Candida shehatae ( 44 , 79 ), Candida tropicalis ( 77 , 78 ), Clavispora sp (108); anaeróbicas pela levedura Pichia stipitis(38 , 39 ) e aeróbica e anaerobicamente pela mutante Candida sp XF 217 ( 64 ).

Entre estas, Pachysolen tannophilus foi a primeira levedura obtida que fermentasse (semi)-anaerobicamente a D-xilose, com os trabalhos originais sendo desenvolvidos em 1980 no National Research Council do Canadá, pelo grupo do Dr. HENRY SCHNEIDER ( 134). No Brasil, o Departamento de Bioquímica



da U.F.Pr. gerou a publicação pioneira nesta temática, utilizando a mesma levedura, como agente fermentativo de hidrolisados ácidos de bagaço de cana (51).

Esta levedura foi descrita originalmente por BOIDIN e ADZET em 1957. A cepa NRRL Y-2460 é diplóide e outras três cepas, também obtidas por BOIDIN, são predominante ou exclusivamente haplóides. Suas células são elipsoidais ou ocasionalmente oblongas e algumas delas possuem um ou dois pequenos apículos. As células diplóides medem  $(2-3,4) \times (3,7-6,5)\mu$  e as células haplóides  $(1,7-2,6) \times (3,1-5,6)\mu$ , portanto bem menores que as células de Saccharomyces. As colônias são branco acinzentadas, brilhantes, mucóides, podendo com o envelhecimento tomar odor butírico e formar hifas (88, 95).

A esporulação é intensa e se processa através da formação de ascósporos. Possui a habilidade de secretar quantidades apreciáveis de fosfomanana extracelular (2, 88).

Em comparação com a tradicional fermentação etanólica de hexoses, a fermentação direta da D-xilose pela levedura Pachysolen tannophilus é um tanto complicada e influenciada por diversos parâmetros, tais como:

#### 4.2.3.1. Aeração

As bases bioquímicas ou fisiológicas do efeito do  $O_2$  no metabolismo da D-xilose não estão bem esclarecidas, podendo estar relacionadas ao transporte da pentose, à assimilação da D-xilose através de uma via redutora/oxidativa, à regeneração de coenzimas reduzidas ou à produção, através da fosforilação oxidativa, de ATP para o crescimento celular (82).

Ainda que a levedura Pachysolen tannophilus produza etanol em condições estritamente anaeróbicas (77, 82, 138), o O xigênio é requisito fundamental para o crescimento desta levedura em D-xilose, bem como em D-glucose (135, 138).

O papel do  $O_2$  no crescimento está associado à incorporação do carbono da D-xilose no material insolúvel do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs, além do que a indução das três enzimas necessárias ao metabolismo inicial da D-

xilose (xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulose quinase) em níveis significativos, somente ocorre na presença de  $O_2$  (106).

A inabilidade do Pachysolen tannophilus em crescer anaerobicamente em D-xilose está relacionada à ausência de NADPH, gerado aerobicamente através do ciclo de Krebs e necessário para a produção de xilitol a partir de D-xilose (106).

Experimentos de SLININGER e colaboradores (138) demonstram claramente, que na ausência de  $O_2$  não há crescimento celular nem fermentação, quando se usa uma baixa concentração de inóculo. Entretanto, quando o meio é inoculado com uma alta concentração celular, a produção de etanol ocorre em condições anaeróbicas (88, 106, 138).

As vantagens do emprego de um inóculo com elevada concentração celular foi explorada por MALESZKA e colaboradores (99), que verificaram que nestas condições, o tempo necessário para atingir a concentração máxima de etanol, era diminuído.

Além disso, um aumento de aeração durante a fermentação, facultava uma maior produção de etanol, que chega a ser máxima com taxas de ar entre 0,45 - 0,5 VVM (135).

Aeração mais vigorosa, leva à produção de etanol mais rapidamente, porém com menores rendimentos (77, 133).

Em cultivos anaeróbicos, Pachysolen tannophilus apresenta uma ativa fermentação de D-xilose com formação simultânea de etanol e ácido acético (77).

Os efeitos desta aeração foram investigados através da adição de inibidores metabólicos. Entre estes, os inibidores respiratórios (azida sódica e antimicina A), não bloquearam a formação de etanol, sugerindo que Pachysolen tannophilus usa uma via não respiratória para a produção deste (77).

Segundo BRUINENBERG e colaboradores (149), esta fermentação anaeróbica da D-xilose somente é possível em leveduras nas quais as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, podem funcionar com o mesmo sistema de coenzimas.

#### 4.2.3.2. Temperatura

Para as células de Pachysolen tannophilus, a temperatura ótima para crescimento e produção de etanol está na faixa dos 32°C, sendo que em temperaturas sub-ótimas (28-30°C), os rendimentos aumentam com o aumento da temperatura (138).

#### 4.2.3.3. pH

Experimentos de SLININGER e colaboradores (138) demonstraram que o crescimento celular e a produção de álcool por Pachysolen tannophilus, são otimizados quando o pH do meio é ajustado para 2,5. A natureza acidófila deste microrganismo, por inibição das funções celulares da maioria dos contaminantes em condições de baixo pH, permite a manutenção de fermentações puras (138).

Entretanto, DEKKER (35) verificou que Pachysolen tannophilus era incapaz de crescer em pH inferior a 3,0. Neste pH obteve um leve crescimento e formação de traços de etanol, porém a viabilidade celular é inferior a 20%. Cresce bem na faixa de 3,5 - 6,5 com produção paralela de etanol.

Para DEBUS e colaboradores (33) o pH ótimo para crescimento é 4,8, portanto para o crescimento é requerido um pH ligeiramente menos ácido do que aquele necessário para a produção otimizada de etanol.

#### 4.2.3.4. Concentração de substrato

Para SLININGER e colaboradores (138), concentrações de D-xilose superiores a 50g/l interferem tanto no crescimento como na produção de etanol. Em contrapartida, DEKKER (35) relatou que a concentração celular foi máxima com concentrações de substrato de 20g/l, enquanto que a concentração de etanol foi máxima, quando a concentração de D-xilose era de 100g/l.

#### 4.2.3.5. Fermentação de outros açúcares

É altamente desejável, que o microrganismo a ser empregado na fermentação de hidrolisados da fração polissacarídica de biomassas vegetais, tenha a capacidade de fermentar, além da D-xilose, uma mistura de açúcares a etanol.

Pachysolen tannophilus cresce em D-glucose, D-manose, D-frutose, L-arabinose, sacarose, celobiose e ácido glucurônico, produzindo etanol a partir de D-glucose, D-manose, D-frutose, L-arabinose, celobiose e ácido glucurônico (quando presente em baixas concentrações = 2%). Os teores de etanol formados a partir de L-arabinose, celobiose e ácido glucurônico são muito baixos quando comparados aqueles obtidos a partir da D-xilose, D-glucose e D-frutose (35).

Apesar de ser classificada taxonomicamente como incapaz de converter a D-galactose a etanol, por só assimilar esta hexose oxidativamente, a levedura Pachysolen tannophilus produz etanol a partir deste carboidrato, após sete dias, quando a fase estacionária de crescimento é atingida (133).

Não utiliza a rhamnose (105).

Em função disto, a levedura Pachysolen tannophilus apresenta um grande potencial para ser empregada na fermentação de uma variedade de hidrolisados, uma vez que possui a capacidade de fermentar eficientemente os quatro açúcares, D-xilose, D-manose, D-glucose e D-galactose, que geralmente respondem por mais de 90% dos carboidratos presentes nas fitobiomassas.

4.2.3.6. Outros: consumo de etanol, inibição por etanol e fenólicos, produção de sub-produtos, como adiante detalha do.

## 5. Rendimentos

Com raras exceções, os rendimentos alcoólicos obtidos em função da fermentação de pentoses são insatisfatórios, quando comparados com os rendimentos teóricos (0,51g de etanol /g de D-xilose consumida = y) (138).

Exemplificando:

<u>Kluyveromyces marxianus</u>	y = 0,28g/g (104)
<u>Candida shehatae</u>	y = 0,29g/g (44)
<u>Candida tropicalis</u>	y = 0,30g/g (78)
<u>Pachysolen tannophilus</u>	y = 0,34g/g (138)

Pichia stipitis

$y = 0,40 \text{ g/g (39)}$

Candida sp XF 217

$y = 0,42 \text{ g/g (64)}$ .

Os baixos teores de etanol, podem ser atribuídos a diversos fatores, quais sejam:

- 5.1. Toxicidade do etanol formado (133,145,162).
- 5.2. Paralelamente à produção de etanol, são formadas quantidades apreciáveis de ácido acético, xilitol e arabinitol como subprodutos (62,105,132).
- 5.3. Consumo do etanol à medida que está sendo formado, ou quando a concentração de substrato passa a ser limitante (35, 98).
- 5.4. Sensibilidade osmótica das leveduras usadas à elevadas concentrações de substrato = inibição pelo substrato (35).
- 5.5. As fermentações não são processadas nas condições tais, que otimizam a produção de etanol.

#### 5.1. Toxicidade do etanol formado

A incapacidade dos microrganismos fermentadores de pentoses em tolerar o etanol formado, em concentrações em média superiores a 6%, se constitui numa das maiores limitações com vistas à obtenção deste solvente, uma vez que as leveduras Saccharomyces cerevisiae e Schizosaccharomyces pombe amplamente empregadas na fermentação etanólica de hexoses, toleram até 12g% de etanol (25).

O fungo Fusarium oxysporum apresenta uma tolerância a etanol entre 5 - 6g% (145), enquanto que concentrações etanólicas entre 3 - 5g% inibem totalmente o crescimento de Fusarium lini (162).

Ainda que, SCHNEIDER e colaboradores (133) demonstraram que na presença de ar, quando a D-xilose é a única fonte de carbono, concentrações de etanol superiores a 4 - 5g% cessam o crescimento de Pachysolen tannophilus e KURTZMAN (88) verificou que esta levedura tolera um pouco mais de 3 - 6g% de

etanol, SLININGER e colaboradores (138) observaram que o "up-take" da D-xilose já é influenciado negativamente quando a concentração de etanol ultrapassa 1,9g%.

Não se conhece exatamente o que torna o microrganismo tolerante ao álcool, no entanto sabe-se que esta tolerância está relacionada à fração de ácidos graxos, quimicamente insaturados, presentes na membrana celular (46).

Trabalhos de BEAVEN e colaboradores (12) com Saccharomyces cerevisiae, demonstraram que a concentração de etanol intracelular era superior àquela extracelular, e que a suplementação das culturas após 8 horas de incubação, com etanol exógeno 1,5M (6,9g%), levava a uma parada no crescimento e diminuição drástica da viabilidade das células. Paralelamente, havia um aumento no conteúdo de ácidos graxos saturados e diminuição dos insaturados, da membrana celular.

Isto poderia ser uma adaptação do microrganismo a elevadas concentrações de álcool, uma vez que estes lipídios alterariam a permeabilidade da membrana celular, reduzindo em consequência sua concentração intracelular (36, 46).

JANSENS e colaboradores (73) confirmaram esta hipótese, ao adicionar uma mistura de lipídios (0,6g ergosterol + 1ml ácido linoleico + 100ml Tween 80) a um meio de cultura à base de lactose, que foi submetido à fermentação alcoólica com a levedura Kluyveromyces fragilis. Como resultado, obteve um decréscimo de 33,3% no tempo de fermentação e um aumento de 10,9% na produção de etanol.

Resultados semelhantes foram obtidos por DEKKER e colaboradores (36) com a levedura Pachysolen tannophilus. Ao incorporar a mesma mistura de lipídios a um meio nutritivo contendo 50g/l de D-xilose como fonte de carbono, observaram que estes também promoviam um aumento na produção de etanol, efeito este que se torna máximo em torno da 72ª hora de fermentação. Obtiveram uma taxa de 0,32g de etanol/g de D-xilose consumida (62% do teórico), ao passo que o controle, ao qual não foram adicionados lipídios exógenos, quando submetido às mesmas condições de crescimento, apresentou uma taxa de 0,20g etanol/

g D-xilose consumida (37% do teórico), apesar da quantidade de biomassa formada não sofrer alteração. Usando-se estes lipídios separadamente, a produção de etanol continua aumentada, porém não sobrepujou a da mistura.

Isto reforça a hipótese da estreita interação entre a membrana e o etanol: o decréscimo da fluidez causado pela presença do etanol, pode inibir a ação da proteína envolvida no transporte do açúcar para o interior da célula, inibição esta que pode ser compensada em células enriquecidas em ácidos graxos insaturados (73).

A análise do extrato lipídico de células de Pachysolen tannophilus crescidas semiaerobicamente em meio, com e sem a adição de lipídios, mostrou que ambos são ricos em ácidos graxos, sendo que os insaturados prevalecem sobre os saturados. As células crescidas na presença de lipídios, apresentaram uma taxa duas vezes superior em ergosterol e quatro vezes superior em ácido linoleico, o que sugere que estes dois compostos são requeridos para aumentar a produção de etanol por Pachysolen tannophilus. Esta parece ser afetada também pela diminuição dos ácidos graxos insaturados (palmitoleico, oleico e linolênico) (36).

## 5.2. Formação de subprodutos

No meio de fermentação, além do etanol, aparecem ácido acético, xilitol e arabinitol (62,105,132).

Os maiores teores de xilitol são produzidos a partir da mistura que possui a maior concentração inicial de D-xilose, enquanto que o arabinitol é formado preferencialmente como subproduto, quando a mistura inicial apresenta uma grande concentração de L-arabinose (105). Além disso, a formação destes subprodutos é afetada pela temperatura empregada. A temperaturas mais elevadas, as pentoses tendem a ser convertidas a xilitol (25).

Tal como a produção de etanol, também a de xilitol, é afetada pela aeração do meio de fermentação. Com taxas de aeração superiores a 0,5VVM, desloca-se significativamente o meta-

bolismo em relação à produção de etanol, em detrimento da de xilitol. No entanto, apesar de aumentar a relação etanol : xilitol, o teor de etanol é também drasticamente reduzido, portanto o controle da aeração isoladamente não é uma estratégia eficiente para minimizar a produção de xilitol (135).

Segundo SCHVESTER e colaboradores (135), para que esta redução na produção de xilitol possa ser alcançada, parece necessário adaptar os microrganismos usados, a altas concentrações de substrato, tornando-os tolerantes a concentrações apreciáveis de etanol (7 - 9g%).

O aparecimento do xilitol no meio de fermentação, ocorre após uma significativa lag-fase, num perfil muito semelhante ao que ocorre com o etanol, sendo que em ambos os casos, a produção se inicia quando a concentração de  $O_2$  dissolvido está próxima a zero (135).

A produção de acetato e xilitol resulta em pequenas, porém significativas perdas na produção de etanol. Sua magnitude foi estimada, assumindo que a formação de acetato resulta numa perda equimolar de etanol e que a formação de xilitol previne a conversão de uma quantidade equimolar de D-xilose a etanol. Para a cepa selvagem de Pachysolen tannophilus, esta perda está entre 7,1 - 12%, enquanto que para a mutante obtida por NEIRINCK e colaboradores (105), que possui um rápido crescimento em D-galactose, a perda está entre 5 - 8,3%, variando em função da composição da mistura empregada (133).

Como o xilitol pode ser encontrado no meio, em conteúdo que pode exceder a 15% da concentração inicial de açúcar, seria desejado ter disponível uma levedura que pudesse aproveitar fermentativamente este xilitol (101).

MALESZKA e SCHNEIDER (101) trabalhando com 15 cepas de leveduras, pertencentes aos gêneros Candida, Pichia, Pachysolen, Kluyveromyces, Debaromyces e Hansenula, observaram que nenhuma delas fermentava xilitol a etanol, concluindo que devido à não fermentabilidade deste pentitol, deve-se otimizar o processo fermentativo com vistas à diminuição da sua produção.



Este problema poderia ser parcialmente superado pelo emprego de duas leveduras muito eficientes na conversão de pentoses a etanol, Pichia stipitis ( 39 , 94 ) e Candida sp XF 217 ( 8 , 63 , 102 ), por possuírem ainda a vantagem adicional de produzir apenas pequenos teores de xilitol. Dentre estas, a Pichia stipitis é particularmente atraente, por possuir ainda a capacidade de hidrolisar xilanas ( 89 ).

### 5.3. Consumo do etanol formado

Em culturas de Pachysolen tannophilus em crescimento, apreciáveis perdas de etanol ocorrem aerobicamente, como resultado do metabolismo, mesmo quando a D-xilose está presente (35, 98). Esta dissimilação também ocorre na presença de outros açúcares, em níveis que variam em função do açúcar presente.

A D-glucose, normalmente presente em hidrolisados ácidos de madeira, é o carbohidrato que mais eficientemente inibe o processo de consumo de etanol, mesmo quando ela está presente no meio numa concentração de 0,1%. O conteúdo de etanol consumido na sua presença, foi de 23% daquele consumido na sua ausência. O valor correspondente para a D-xilose é de 37% ( 98 ).

O consumo de etanol requer a presença de  $O_2$ , uma vez que aumentando a disponibilidade de  $O_2$ , há uma diminuição no tempo de geração da levedura e um aumento no conteúdo de etanol consumido ( 98 ).

Em uma série de experimentos de MALESZKA e SCHNEIDER ( 98 ), nos quais etanol foi produzido a partir de D-xilose, o conteúdo de etanol consumido foi equivalente a pelo menos, 9,8% do total de etanol produzido.

Além dessas, devem ser consideradas as perdas de etanol por volatilização, que chegam a atingir 5% do teor inicialmente presente ( 31 ).

Efeitos semelhantes de consumo de etanol, também foram verificados em Fusarium lini ( 162 ), Fusarium oxysporum ( 145 ), Candida sp XF 217 ( 63 ) e Candida shehatae ( 102, 161 ).

Este consumo de etanol por Fusarium lini, foi retardado significativamente por NORD e MULL (109), ao suplementarem o meio de cultivo com KCN.

No sentido de diminuir o consumo de álcool e a produção de xilitol por Pachysolen tannophilus, estudos de LEE e colaboradores (90) demonstraram com sucesso que, aumentos significativos nos teores de etanol a partir de D-xilose podem ser conseguidos através de mutações, que reduzem a habilidade do microrganismo de utilizar o álcool como fonte de carbono. Mutações genéticas induzidas por irradiação com luz ultravioleta, ocorrem em 11 diferentes "loci", 3 dos quais conferem rendimentos etanólicos aumentados, decorrentes da diminuição da taxa de oxidação de etanol, associada à diminuição da produção de xilitol. Estas mutantes são deficientes na enzima malato desidrogenase, portanto possuem um ciclo de Krebs incompleto, não relacionado até o momento, com o decréscimo nos teores de xilitol formados.

Resultados semelhantes foram publicados por MALESZKA e colaboradores (100), após terem verificado que aumentando o número de cromossomos de Pachysolen tannophilus, havia um aumento na taxa de crescimento, no conteúdo de etanol e uma paralela diminuição na formação de xilitol. O aumento na produção de etanol já ocorre quando se passa da célula haplóide para a diplóide, porém os mais altos valores são obtidos com a célula triplóide e tetraplóide.

Assim o uso de células poliplóides, parece ser um instrumento útil para processar mais eficientemente a fermentação de pentoses. Estes efeitos observados com o aumento do número de cromossomos, provavelmente refletem complexos sistemas fisiológicos, uma vez que não alteram a atividade das duas enzimas responsáveis pelo catabolismo inicial da D-xilose (xilose redutase e xilitol desidrogenase) e apenas afetam ligeiramente, a atividade da álcool desidrogenase em células tetraplóides.

Um aumento na produção de etanol também foi observado por MALESZKA e colaboradores (99) e JEFFRIES (77), ao em

pregarem na fermentação de pentoses, células de Pachysolen tannophilus imobilizadas em alginato de cálcio.

Uma outra técnica que aumenta eficientemente a produção de etanol a partir de D-xilose, é a reciclagem de células (26, 99, 105, 133).

A partir de uma solução de D-xilose a 2% em YNB 0,67%, inoculada a uma densidade ótica inicial de 0,05 e incubada em condições aeróbicas a 30°C, a cada 24 horas as células, separadas por centrifugação, eram inoculadas em meio novo e incubadas nas mesmas condições. A concentração celular cresce, bruscamente para 1,2 já após o primeiro reciclo e então lentamente até 1,4 no decurso dos 11 reciclos experimentados. A concentração de etanol, igual a 0,075g% no primeiro reciclo, se eleva a 0,75g% após o quarto reciclo. Quando este experimento foi realizado a 37°C, obtiveram-se teores de etanol de 0,79g%, equivalentes a um rendimento teórico de 78% (99).

A fermentação de pentoses com reciclagem de células ou imobilizadas em alginato de cálcio, tem a vantagem de não requerer aeração contínua, pois resultados similares foram obtidos em condições aeróbicas, semiaeróbicas e mesmo anaeróbicas em atmosfera de  $H_2$  e  $CO_2$  (26, 99).

Este incremento na taxa de produção de etanol como resultado da reciclagem de células de Pachysolen tannophilus, é devido em parte, à alta concentração celular para processar a conversão, ao mesmo tempo em que tem papel fundamental na manutenção da taxa de  $O_2$  dissolvido em níveis baixos. Ainda, a reciclagem de células propicia a remoção de produtos metabólicos inibidores e a suplementação de elementos traços, já consumidos no meio desgastado (133).

Experiências de NEIRINCK e colaboradores (105) e SCHNEIDER e colaboradores (133), através do uso de etilmetano sulfonato, levaram à seleção de uma mutante de Pachysolen tannophilus, que apresentou um rápido crescimento em D-galactose (tempo de geração em D-galactose a 2% = 6,5 horas, 73% inferior ao tempo de geração da cepa selvagem).

Com esta mutante, a D-galactose e os outros açúcares

(com exceção da L-arabinose), foram utilizados completamente em 18 horas, com rendimentos etanólicos variáveis entre 83-90%, dependendo da composição do meio (selvagem apresentou rendimentos de 76-84%) (105).

## 6. Fermentação de hidrolisados de fitobiomassa

As dificuldades encontradas, quando se pensa no aproveitamento fermentativo da fração hemicelulósica, resultante do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, com vistas à obtenção de etanol, são inúmeras, uma vez que durante os processos de pré-tratamentos por hidrólise ácida e vapor sob pressão, são formadas substâncias inibitórias, decorrentes da degradação de açúcares e/ou lignina, que são tóxicas para a grande maioria dos microrganismos (20) e algumas enzimas, como a  $\beta$ -glucosidase (37).

KATO e SHIBASAKI (84) investigaram a produção de substâncias antimicrobianas pelo aquecimento de D-xilose e compostos aminados em soluções alcalinas e verificaram que a presença destes compostos aminados, não é necessária para a produção daquelas. Tratando uma solução de D-xilose 0,3M em tampão carbonato pH 10,6 a 120°C durante 20 minutos, obtiveram quatro compostos fenólicos, extraídos da mistura através de solventes orgânicos (acetona e benzeno) e identificados por cromatografia líquida, como sendo: catecol, 3-metilcatecol, 4-metilcatecol e metilhidroquinona, todos inibitórios para Saccharomyces cerevisiae e Candida utilis.

Os compostos inibidores encontrados em hidrolisados de fitobiomassas, incluem principalmente: furfural, hidróximetilfurfural, vanilina, siringialdeído, fenol (37), ácido acético (14,160), dimetilcetona, propionaldeído, N-propionaldeído (109) e o benzaldeído (37).

Além destes, que são produzidos durante a hidrólise ácida, devem ser considerados os metais que poderão ser liberados do recipiente de hidrólise. Entre estes, temos o Fe, Cr, Cu e Ni, que em concentrações de 0,7; 0,1; 0,1 e 0,04g% respectivamente, inibem a produção de etanol por Pachysolen tannophilus (160).

Esta produção de etanol também é inibida por uma concentração de ácido acético de 0,7g% (160).

Segundo DEKKER (37) os compostos fenólicos são mais tóxicos, que os produtos de degradação de açúcares, como o furfural.

O furfural e o hidróximetilfurfural (HMF) são os inibidores mais extensivamente citados na literatura

Uma concentração inicial de 3g/l de furfural, no meio a ser fermentado com Saccharomyces cerevisiae, diminui a multiplicação celular e a produção de etanol a níveis de 59 e 33%, respectivamente. (6).

Ainda que, esta levedura seja mais sensível a furfural do que ao hidróximetilfurfural (6), uma concentração de HMF igual a 0,5% inibe o crescimento, enquanto que a produção de etanol é inibida a 0,2% (1).

Em experiências com Saccharomyces cerevisiae, o furfural desaparece rapidamente do meio, nos primeiros estágios de fermentação, em decorrência da sua metabolização pelas células da levedura e interação com componentes do hidrolisado, atingindo valores de 60% da concentração inicialmente presente (6).

A produção de etanol por Zymomonas mobilis também foi diminuída em 40% quando presentes 0,5g% de furfural no meio de fermentação (129).

Para a levedura fermentadora de pentoses Pachysolen tannophilus, uma concentração de furfural entre 0,25 - 0,30 % já é letal (42). A presença de concentrações subletais, afetam tanto a multiplicação celular, como a produção de etanol.

Usando-se uma alta concentração de inóculo, consegue-se eliminar a longa lag-fase causada pela presença do furfural (6).

DETROY e colaboradores (41) submeteram hidrolisados ácidos de palha de trigo contendo 4,3% de D-xilose, à fermentação alcoólica por Pachysolen tannophilus. Ainda que, toda a D-xilose foi consumida em 4 dias, obtiveram apenas 0,72% de etanol, devido à presença de inibidores.

Os fungos do gênero Fusarium (82,152) e a levedura

Candida shehatae ( 14 ) são particularmente sensíveis aos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados.

Esta ação tóxica está relacionada à inibição da triosefosfato desidrogenase e álcool desidrogenase pelo furfural (165).

Devido à sua ação inibitória, estas substâncias tóxicas deverão ser previamente removidas, para que a fermentação de hidrolisados de biomassas possa ser processada eficientemente.

A extração destes inibidores pode ser feita por:

- a) Carvão ativo ( 82 ,155).
- b) Sulfito de sódio a quente ( 92 ,165).
- c) Hidróxido de cálcio\* (109).
- d) Acetato de etila ( 37 ).
- e) Etanol a 70%\*\* ( 42 ).
- f) Éter ( 42 ).
- g) Acetona ( 84 ).
- h) Benzeno ( 84 ).
- i) Norite a 2g% ( 97 ).
- j) Resinas aniônica (Amberlite IRA-45) e catiônica (Dowex 50W) (103).
- k) Resina composta por:
  - 53 partes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou 66 partes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - 60 partes de formaldeído
  - 44 partes de acetaldeído (109).
- l) Concentração ( 92 ,109).
- m) Destilação ou arraste com vapor ( 14 , 92 ).

\* Remove também 19,41% dos açúcares.

\*\* Remove 71% da lignina e 25% das pentosanas.

NORD e MULL (109), tratando lixívias sulfúricas com  $\text{Ca(OH)}_2$  até pH 10,5 e 12,2 para remover por precipitação, compostos sulfurosos e derivados de lignina, respectivamente, obtiveram crescimento de Fusarium lini.

Mc CRACKEN e GONG (103) submeteram hidrolisados ácidos de bagaço de cana (pH=1) a tratamentos com uma resina aniônica (Amberlite IRA-45), seguido de uma resina fortemente ácida (Dowex 50W). Os hidrolisados obtidos foram neutralizados a pH 6 com  $\text{NH}_4\text{OH}$  e fermentados com a levedura termotolerante, Candida sp XF 217, obtendo com sucesso rendimentos etanólicos, apenas ligeiramente inferiores aos obtidos quando a D-glucose foi a fonte de carbono usada.

A influência do pH, na tolerância dos microrganismos ao furfural e ácido acético (presente em hidrolisados ácidos de madeiras duras numa proporção de 1g/4g D-xilose) foi investigada por BECK (14). Submetendo a levedura Candida shehatae, a concentrações variáveis de furfural e/ou ácido acético em pH 4,5 - 5,5 verificou que esta levedura tolera-os melhor a pH 5,5. O furfural e parte do ácido acético (20%) foram removidos de hidrolisados ácidos de madeiras duras por arraste de vapor. Este meio, suplementado com uréia e extrato de levedura apresentou, quando submetido à fermentação com Candida shehatae, um rendimento em etanol de 0,35g/g de D-xilose consumida (14).

GONG e colaboradores (63) registraram que a mutante Candida sp XF 217, produz etanol a partir de hidrolisados ácidos de madeira, sem prévio tratamento. A conversão direta dos açúcares (predominantemente a D-xilose) a etanol, ocorre mais rapidamente em condições aeróbicas do que fermentativas, sendo que as taxas de conversão semiaeróbicas podem ser aumentadas significativamente, pela adição de xilose isomerase ao meio. O teor de etanol formado, baseado na quantidade de açúcar consumido, foi de aproximadamente 90% do teórico.

## OBJETIVOS

O processamento fermentativo da biomassa celulósica , para fins de produção de combustíveis líquidos alternativos ao petróleo, exige pré-tratamentos determinados pela heterogeneidade da matéria prima: celulose-hemicelulose-lignina.

A labilidade frente a ácidos minerais, segue a seguinte ordem: hemicelulose > celulose >> lignina. O tratamento ácido mineral clássico ( $\text{HCl}$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para a gradativa liberação de pentoses e hexoses a partir de holocelulose de Angiospermas e Gimnospermas, implica na produção de quantidades apreciáveis de subprodutos, como o furfural a partir de pentoses e o hidróxi-metilfurfural de hexoses, ambos tóxicos para os microrganismos a serem empregados no processo fermentativo.

Mais ainda, o ulterior processo fermentativo exige a co-destilação ou a precipitação com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dos catalisadores ácidos minerais,  $\text{HCl}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  respectivamente, em vista do efeito inibitório dos ânions cloreto e sulfato nas concentrações usadas, no processo fermentativo posterior.

Em vista da grande diferença de estabilidade entre as frações hemicelulósica e celulósica a ácidos minerais, o presente trabalho se propõe à abordagem do uso do **ÁCIDO FOSFÓRICO** diluído, como agente catalítico na hidrólise e/ou pré-tratamento de holoceluloses, com as seguintes observações e vantagens:

I) Nas mesmas condições que a hidrólise clorídrica ou sulfúrica (pressão > 1atm.; temperatura > 100°C), um ácido mais débil tal como o ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), é esperado ser mais seletivo para a hidrólise de pentosanas, em condições de baixa degradação da D-xilose a furfural.

II) Ao contrário dos ácidos clorídrico e sulfúrico, o



ácido fosfórico, para fins de fermentação, não precisa ser eliminado do hidrolisado rico em pentoses, pois sua neutralização parcial com  $\text{NH}_4\text{OH}$  provê os dois nutrientes básicos, P e N, que acrescidos da fonte de carbono presente nos hidrolisados, asseguram as necessidades básicas dos microrganismos a serem empregados no processo biotecnológico posterior.

III) Avaliar o grau de alteração na cristalinidade da fração celulósica e sua proteção pelo escudo da lignina, com vistas à depolimerização enzimática do maior componente da holoceleulose: a celulose, que no pré-tratamento fosfórico aparece como lignocelulose residual.

Como modelos de holo(ligno)celuloses serão testados os bagaços de cana de açúcar e sorgo (gramíneas = Angiospermas) e serragem de pinheiro (Pinus taeda: conífera = Gimnosperma). O primeiro modelo é representativo da atividade agrícola que experimentou o maior crescimento no País, no último decênio ou seja, a indústria açucareira/alcooleira, e o segundo é essencial florestal adotada nos programas de reflorestamento do Paraná e outros estados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. MATERIAIS

- 1.1. Os bagaços de cana (Saccharum officinarum) foram fornecidos pela Usina Bandeirante; os de sorgo sacarino (Sorghum bicolor) pelo Prof. Plínio Conter de Pelotas; a serragem de bracatinga (Mimosa scabrella) pelo laboratório do Prof. João Batista C. Correa e os troncos de Pinus taeda, pela Escola de Florestas da U.F.Pr.
- 1.2. As enzimas celulolíticas foram gentilmente cedidas pelo Dr. J.E. Thiemann da Biobrás-Bioferm (M.G.).
- 1.3. Todos os reagentes utilizados foram considerados quimicamente puros, isto é, produtos p.a., adquiridos da Merck do Brasil, Sigma Chemical e BDH Produits Chimiqués.

### 2. MÉTODOS

#### 2.1. Métodos Gerais

- As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório Büchi, modelo RE 120, a vácuo e em banho de água com temperatura externa de 70°C.
- As medidas de pH foram tomadas à temperatura ambiente em aparelho Micronal, modelo B-247.
- As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em aparelho Coleman Júnior, modelo 6A, para a região do espectro visível ou em aparelho Intralab, modelo DMS 80, para a faixa do espectro ultravioleta.

- As centrifugações foram realizadas em centrífuga Fanem , modelo 204-SR.
- As secagens dos materiais foram realizadas em estufa Fanem, modelo 315-SE, em temperatura variável de 50-80°C.
- A filtração dos hidrolisados foi feita, após resfriamento, através de papel Wheaton, em funil de Büchner adaptado a uma trompa de vácuo ou em funil de placa porosa M.
- As incubações foram feitas em agitador-incubador de movimento rotatório New Brunswick a 28°C e 110 rpm ou a 45°C e 150 rpm.
- As esterilizações dos meios de cultivo foram feitas em autoclave Fanem, modelo 103, durante 30 minutos sob vapor fluente ou a 1 atm durante 30 minutos.

## 2.2.MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.2.1. Métodos colorimétricos

#### 2.2.1.1. Carbohidratos totais (CT)

Os carbohidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por DUBOIS e colaboradores ( 45 ). O complexo colorido, resultante da conjugação do hidro\_ximetilfurfural ou furfural com o fenol, foi lido a 490nm (hexoses) ou 480nm (pentoses), usando-se respectivamente a D-glucose ou a D-xilose como padrões, na faixa de sensibilidade de 10 a 30µg/ensaio, com volume final de 3,5ml.

#### 2.2.1.2. Carbohidratos redutores (CR)

Os carbohidratos redutores (pentoses e hexoses) foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (107,140). A mistura final de óxidos de molibdênio foi lida a 535nm, usando-se D-xilose como padrão, na faixa de 10 a 50µg/ensaio, com volume final de 5ml.

#### 2.2.1.3. Fósforo

O fósforo foi determinado através do molibdato de amônia em meio sulfúrico (R.A. WOLOSUK - comunicação pessoal).

#### 2.2.1.4. Etanol

O etanol foi determinado também após oxidação parcial em presença de dicromato de potássio e ácido sulfúrico (54).

#### 2.2.2. Métodos cromatográficos

##### 2.2.2.1. Cromatografia em papel

A determinação qualitativa da composição em açúcares das amostras, foi feita por cromatografia em papel, pela técnica da irrigação ascendente única, usando-se como fase estacionária papel Whatman nº 1 e como fase móvel, o seguinte sistema de solventes: benzeno:1-butanol:piridina:água (1:5:3:3, v/v/v/v, fase superior).

A visualização dos açúcares foi possível pelo emprego do nitrato de prata alcalino (151).

##### 2.2.2.2. Cromatografia líquida-gasosa (g.l.c.)

###### 2.2.2.2.1. Determinação quantitativa dos açúcares na forma de acetatos de alditóis

A cromatografia líquida-gasosa foi realizada em cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama, usando-se o  $N_2$  como gás de arraste (37,5ml/minuto).

As temperaturas da câmara de injeção e do detector foram de 200°C e 240°C, respectivamente. A coluna de aço inoxidável empregada (200 x 0,15 cm diâmetro interno) foi empacotada com ECNSS-M a 3% (p/p) sobre Chromosorb Q de 80-100 mesh, sendo utilizada para a determinação quantitativa dos acetatos de alditóis à temperatura de 180°C.

###### 2.2.2.2.1.1. Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida e/ou solvólise

As misturas de açúcares obtidas dos polissacarídeos hidrolisados, foram deionizadas com resina mista MB-3 e reduzidas com boroidreto de sódio durante 3 horas, à temperatura ambiente, sob agitação ocasional. Após esse período, as soluções reduzidas foram tratadas com ácido acético 1:2, até não haver mais efervescência, filtradas por papel e evaporadas à secura. O ácido bórico resultante deste tratamento, foi eliminado na forma de seu éster volátil, o borato de trimetila, por sucessivas co-destilações com metanol. Os alditóis obtidos, foram então submetidos à acetilação com anidrido acético e acetato de sódio à temperatura de 70-80°C, durante 14 horas.

Posteriormente, o processo de acetilação foi interrompido pela adição de água gelada e os açúcares acetilados, foram extraídos com clorofórmio. A fração clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada por algodão. Após evaporação do solvente, os acetatos de alditóis foram analisados por g.l.c., nas condições descritas anteriormente.

Como a metodologia antes descrita não facilita a detecção de açúcares ácidos (e.g., glucurônico), em função da natureza da fase estacionária e tipo de derivatização, uma corrida complementar foi feita a partir de derivados per-sililados em coluna de SE-30.

As determinações quantitativas dos materiais analisados por g.l.c. foram calculadas em função da área registrada para cada componente, pelo método da triangulação (131).

#### 2.2.2.2.2. Determinação de etanol, furfural e ácido acético

Também foram analisados por g.l.c. em cromatógrafo CG, modelo 37, com detector de ionização de chama e todas as condições de operação anteriormente descritas. A coluna utilizada foi a de Porapak Q.

#### 2.2.3. Método turbidimétrico

A avaliação da concentração celular foi feita por

turbidimetria, após diluição adequada de uma alíquota dos cultivos com água destilada, de modo a obter densidade ótica não superior a 0,60 (onde há linearidade entre a densidade ótica e a concentração celular) e determinação da sua absorbância a 650nm (138).

#### 2.2.4. Métodos gravimétricos

##### 2.2.4.1. Peso seco

A avaliação da concentração celular foi ainda acompanhada pela determinação do peso seco de uma amostra do cultivo, após centrifugação, lavagem do sedimento por duas vezes com água destilada e secagem do mesmo em estufa a 80°C, até peso constante.

A liofilização foi aplicada alternativamente como meio de eliminação mais suave para a água.

##### 2.2.4.2. Lignina

A determinação da lignina foi feita por gravimetria do resíduo seco obtido após hidrólise de Saeman da lignocelulose remanescente da hidrólise enzimática (130).

#### 2.3. MOAGEM E LAVAGEM DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

A pulverização dos resíduos (cana, sorgo, pinus e bracatinga) foi realizada em moinho Wiley, sob malha nº 40 (diâmetro interno = 0,42mm).

Nos casos particulares dos bagaços de cana e sorgo, resíduos da indústria açucareira/alcooleira, estes poderão vir acompanhados, dependendo do método de extração do caldo, de até 5% de sacarose residual. A remoção destes açúcares residuais livres, foi feita pela exaustiva lavagem dos resíduos finamente pulverizados com água, inicialmente corrente e depois destilada, até reação negativa do filtrado frente ao fenol-ácido sulfúrico (45).

## 2.4. HIDRÓLISE

As hidrólises ácidas e as solvólises (controles nos quais o ácido foi substituído pela água destilada), foram realizadas em autoclave comum Fabbe, modelo 103, em faixas de pressões que não excediam as 2,5 atm (139°C); em câmara de combustão de Parr na faixa de temperatura entre 160 - 200°C para experimentos cinéticos em pequena escala ou em reator para média pressão, de chapa de aço inoxidável reforçada, dotado de múltiplas válvulas de admissão e saídas, válvula de balanço de segurança e monitoramento manométrico e termométrico das condições de operação entre 1 - 15 atm (aparelho construído sob encomenda, pela Metalúrgica C. Schybior, Curitiba).

### 2.4.1. Relação catalisador : biomassa (solução ácida diluída: biomassa).

Alíquotas de 1g de serragem de Pinus e/ou cana (40 mesh; 10,20g% umidade) foram inchadas em  $H_3PO_4$  a 0,5% (v/v) em proporções de 1:6; 1:7; 1:8; 1:9 e 1:10 e hidrolisadas sob pressão de 2 atm, durante 2 horas e 30 minutos. Após resfriamento, os hidrolisados foram filtrados em funil de placa porosa M, tiveram seus volumes aferidos para 11ml, nos quais se determinou a concentração de CT e CR.

Para verificar a influência do grau de pulverização na hidrólise, tomou-se paralelamente 1g da mesma serragem mais grosseiramente pulverizada (20 mesh = 0,841mm), que foi submetida ao mesmo tratamento, com uma proporção serragem:ácido diluído de 1:10.

### 2.4.2. Potencial do ácido fosfórico como alternativa de hidrólise para pentosanas

Para verificar o potencial do ácido fosfórico, em hidrolisar pentoses, relativamente aos ácidos classicamente descritos na literatura (HCl ou  $H_2SO_4$ ), alíquotas de resíduos celulósicos de bagaço de cana e de sorgo foram hidrolisadas com

os respectivos ácidos a 0,5% (p/v) durante 2 horas a 2 atm (134°C), mantendo-se uma relação bagaço : solução ácida diluída de 1:10 (p/v).

Nas mesmas condições, processou-se um controle de solvólise ou autohidrólise.

Nos filtrados límpidos dos hidrolisados e solvolisados, avaliou-se quantitativamente a liberação de açúcares livres, pela dosagem de CT e CR e qualitativamente, por g.l.c. e cromatografia em papel.

#### 2.4.3. Rehidrólise do bagaço residual

A verificação da eficiência da hidrólise fosfórica na depolimerização da fração de pentosanas, além da avaliação de CT e CR e análise cromatográfica, foi comprovada pela rehidrólise do bagaço residual, nas mesmas condições do primeiro ciclo de autoclavação (2 horas; 2 atm;  $H_3PO_4$  a 0,5%). Como controle adicional da remoção de substituintes furanosídicos, o resíduo da autohidrólise do experimento anterior, foi da mesma maneira, hidrolisado com  $H_3PO_4$ .

#### 2.4.4. Força destrutiva de ácidos minerais

Para comparar quantitativamente a co-produção de derivados de açúcares por desidratação, catalisada pelos ácidos fosfórico, clorídrico e sulfúrico, os filtrados límpidos dos hidrolisados ácidos obtidos conforme procedimento descrito em 2.4.2., foram analisados por g.l.c. em coluna de Porapak Q, comparativamente à um padrão de furfural.

#### 2.4.5. Avaliação de parâmetros cinéticos da hidrólise fosfórica

##### 2.4.5.1. Efeito da $[H_3PO_4]$ e tempo de residência sob pressão constante de 2,5 atm

Alíquotas de 1g de bagaço de sorgo (umidade = 11,5%) foram hidrolisadas com concentrações variáveis de  $H_3PO_4$  v/v (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25%), sob pressão constante de



2,5 atm em autoclave comum, durante 30, 60, 90 e 120 minutos.

2.4.5.2. Efeito da  $[H_3PO_4]$  e pressões variáveis no tempo de residência constante de 1 hora.

Alíquotas de 1g de bagaço de sorgo (umidade = 11,5%) foram hidrolisadas com concentrações variáveis de  $H_3PO_4$  v/v (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25%), sob pressões de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 atm em autoclave comum, durante 1 hora.

O material hidrolisado, obtido como descrito em 2.4.5.1. e 2.4.5.2., após resfriamento, foi filtrado em funil de placa porosa M e teve seu conteúdo de CT e CR avaliado.

Nos dois experimentos, a relação bagaço : solução ácida diluída foi mantida constante em 1:10, sendo feitos paralelamente controles de solvólise, processados nas mesmas condições.

2.4.6. Limite mínimo de catalisador

2.4.6.1. Efeito da  $[H_3PO_4]$  em tempo de residência (1 hora e 15 minutos) e temperatura (170°C) constantes

Alíquotas de 2g de bagaço de cana (umidade = 10,46%) foram pesadas em tubo de ensaio e adicionadas de 20ml de água destilada (solvólise) ou  $H_3PO_4$  (0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% v/v).

A mistura foi colocada a 170°C durante 1 hora e 15 minutos em câmara de combustão de Parr (o tempo de 15 minutos foi o constatado como necessário para que a mistura atinja a temperatura de 170°C).

2.4.6.2. Efeito da temperatura frente à  $[H_3PO_4]$  constante de 0,0625% (v/v)

Alíquotas de 2g de bagaço de cana (umidade = 10,46%) foram pesadas em tubo de ensaio e adicionadas de 20ml de  $H_3PO_4$  0,0625% (v/v) e hidrolisadas durante 1 hora e 15 minutos em câmara de combustão de Parr a 160, 170, 185 e 200°C.

Após resfriamento, os solvolisados e hidrolisados ob

tidos como descrito em 2.4.6.1. e 2.4.6.2., foram filtrados em funil de placa porosa M, tendo em seguida seu conteúdo de CT e CR determinado.

#### 2.4.7. Hidrólise fosfórica comparativa de Angiospermas (cana , sorgo e bracatinga) e Gimnospermas (pinus)

Pesaram-se 500mg de cada um dos resíduos (umidade: cana = 7,41%; bracatinga = 11,98%; sorgo = 9,83% e pinus = 9,6%) em tubos de ensaio, aos quais foram adicionadas, na proporção de 1:10, água destilada (solvólise) ou  $H_3PO_4$  nas concentrações indicadas (0,1; 0,25 ou 0,50% v/v).

Estes foram levados à autoclave pelo tempo suficiente para que a pressão atingisse 3, 4, 5 e 6 atmosferas (de 32 a 45 minutos para os pontos extremos, a partir do início do aquecimento).

Tão logo a pressão foi atingida, a chama foi desligada e após resfriamento os hidrolisados e solvolisados foram filtrados em funil de placa porosa M e lavados com mais 1 volume de água destilada. Nos filtrados límpidos obtidos, foi determinada a concentração de CT e CR.

As modalidades executadas foram as seguintes:

- a) Solvólises em pressões de 3, 4, 5 e 6 atm.
- b) Hidrólises fosfóricas com  $H_3PO_4$  a 0,1% (v/v) e pressões variáveis (3, 4 e 5 atm).
- c) Hidrólises fosfóricas com  $H_3PO_4$  de 0,1; 0,25 e 0,5% (v/v) e pressão de 5 atm.
- d) Hidrólises fosfóricas com  $H_3PO_4$  a 0,5% (v/v) a pressões de 5 e 6 atm.

A qualificação dos açúcares presentes nas amostras - solvólise a 6 atm e hidrólise com  $H_3PO_4$  a 0,5% (v/v) a 6 atm, foi feita através da análise de seus acetatos de alditóis por g.l.c., nas condições descritas em 2.2.2.2.1.

#### 2.4.8. Hidrólise fosfórica de bagaços de cana e sorgo, previamente clorados

##### 2.4.8.1. Cloração das amostras

2g de cada um dos bagaços foram colocados em Erlenmeyer de 250ml, adicionados de 50ml de água destilada gelada e colocados em banho de gelo. Em seguida, cada um dos frascos foi borbulhado com gás cloro, durante 10 minutos.

##### 2.4.8.2. Extração da clorolignina formada

Aos 175ml da suspensão obtida no item anterior, adicionou-se um volume de etanol frio e procedeu-se à filtração em funil de placa porosa M.

O resíduo foi lavado, inicialmente com 3 volumes de etanol fervente, seguido de um volume de etanolamina a 3% em etanol a 95% fervente e finalmente com 2 volumes de etanol fervente. Finalmente, a lavagem foi completada com 4 volumes de água destilada fria.

##### 2.4.8.3. Hidrólise fosfórica do resíduo delignificado

O bagaço delignificado foi em seguida hidrolisado com  $H_3PO_4$  a 0,5% (v/v) durante 1 hora a 2 atm, numa relação bagaço:solução ácida diluída de 1:10.

#### 2.4.9. Tratamento dos hidrolisados

Com a intenção de detectar e eliminar substâncias inibitórias, tóxicas para os microrganismos a serem empregados no processo fermentativo posterior (20), que se formam, inevitavelmente, durante a depolimerização ácida de pentosanas, alíquotas dos hidrolisados límpidos de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; relação bagaço:ácido diluído = 1:5; 10 atm), foram submetidas aos seguintes tratamentos:

##### 2.4.9.1. Concentração por 2 vezes até xarope, seguida de resuspensão em água destilada (92,109).

- 2.4.9.2. Extração com um volume de acetato de etila (37 ).
- 2.4.9.3. Neutralização até pH 4 e extração com um volume de clorofórmio, lavado previamente com água destilada para eliminação do etanol que contém (0,6 - 1,0%).
- 2.4.9.4. Tratamento com carvão ativo (82,155), durante 20 minutos sob agitação, seguido de filtração em papel de filtro pregueado.

Tanto os hidrolisados controle (sem tratamento), como os hidrolisados tratados e os solventes extratores, foram analisados para furfural por g.l.c. nas condições descritas em 2.2.2.2.2.

## 2.5. PROCESSO FERMENTATIVO

### 2.5.1. Microrganismos

A amostra original do fungo Fusarium oxysporum foi gentilmente cedida pelo Dr. J. Wright do Departamento de Botânica da Universidade de Buenos Aires; a levedura Pachysolen tannophilus 1 (NRRL-2460) pelo Prof. Bonifácio J. Gallotti do Departamento de Farmácia da U.F.Pr. e as demais leveduras Pachysolen tannophilus 2 (NRC-5565), Candida shehatae 1 (NRC - 2883) e Pichia stipitis 6 (NRC-5568) pelo Dr. H. Schneider do National Research Council do Canadá.

### 2.5.2. Meios de cultura empregados

#### 2.5.2.1. Meio YM (yeast medium) para manutenção das cepas

A composição do meio de cultura empregado era a seguinte:

Extrato de malte	0,3g%
Extrato de levedura	0,3g%
Peptona	0,5g%
<u>D</u> -xilose	1,0g%
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100ml

O meio foi distribuído em tubos, esterilizado em autoclave por 30 minutos sob vapor fluente, sendo em seguida os tubos inclinados para solidificação.

#### 2.5.2.2. Meio para desenvolvimento do inóculo

O meio líquido utilizado para o desenvolvimento do inóculo, tinha a seguinte composição:

<u>D</u> -xilose	2,0g%
Extrato de levedura	0,5g%
Solução de Vogel (154)	0,5ml%
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100ml

A solução de açúcar foi preparada 10 vezes concentrada e esterilizada a 1 atm durante 20 minutos e após resfriamento foi incorporada à solução dos demais constituintes esterilizados nas mesmas condições.

#### 2.5.2.3. Meios para a fermentação

Na busca do meio fermentativo idealizado, isto é, xarope de pentoses sem suplementação ou se necessário, nas quantidades mais reduzidas possível, as fermentações receberam suplementações reduzidas se comparadas às habitualmente descritas na literatura (134) e aparecem discriminados nos experimentos.

#### 2.5.3. Conservação das amostras

As amostras dos microrganismos foram cultivadas em meio YM por 3 dias, a 28°C e estocadas em geladeira a 4°C, fazendo-se transferências semestrais.

#### 2.5.4. Preparo do inóculo

Uma porção micelial do fungo filamentoso ou uma alça das culturas das leveduras em meio YM, foram transferidas asepticamente para um frasco Erlenmeyer de 250ml de capacidade, contendo 50ml do meio descrito em 2.5.2.2.

O desenvolvimento se processou com agitação contínua

em agitador incubador de movimento rotatório a 110rpm, 28°C por 24 - 96 horas.

Após este período de tempo, a suspensão de células foi centrifugada, lavada com solução salina estéril e do sedimento cremoso, alíquotas foram usadas para inocular os meios de fermentação, numa relação usual de 1/50 ou 1/100 do hidrolisado a ser fermentado.

Uma relação de 1:5 entre o volume do meio e o volume do frasco a ser incubado, foi mantida constante em todos os cultivos e experimentos realizados durante o trabalho.

#### 2.5.5. Fermentação propriamente dita

Todos os experimentos fermentativos foram realizados em agitador incubador a 28°C e 110 rpm, com retiradas de amostras em intervalos regulares para determinação da  $DO_{650nm}$  (controle de crescimento) e após centrifugação, dosagem de CT, CR e etanol nos fermentados límpidos.

##### 2.5.5.1. Experimentos fermentativos onde a D-xilose p.a. foi a fonte de carbono utilizada

##### 2.5.5.1.1. Efeito dos íons fosfato para Pachysolen tannophilus

Para verificar a influência dos íons fosfato no crescimento da levedura, bem como na produção de etanol pela mesma, foi utilizado um meio básico, constituído de:

<u>D</u> -xilose	2,0g%
Extrato de levedura	0,1g%
Solução de Vogel	0,5ml%
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100ml

A este meio, foram adicionadas quantidades variáveis de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> xaroposo a 85%, de modo a obter em cada cultivo uma concentração final de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v) de: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 2,00%.

Os meios de cultivo tiveram seu pH acertado para 4,0 com NH<sub>4</sub>OH a 10% (v/v), tendo sido feito paralelamente um expe

rimento controle, sem a adição de  $H_3PO_4$ .

#### 2.5.5.1.1.1. Precipitação dos polissacarídeos

Os cultivos de 96 horas remanescentes do experimento descrito em 2.5.5.1.1., foram centrifugados a 3.500 rpm durante 10 minutos. Do sedimento celular cremoso, após duas lavagens com água destilada, seguida de novas centrifugações, determinou-se o peso seco micelial e do fermentado límpido sobrenadante, os polissacarídeos foram precipitados pela adição de 3 volumes de etanol. Após centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos, foram separados os precipitados etanólicos, os quais foram pesados após secagem a 80°C durante 24 horas.

#### 2.5.5.1.2. Efeito dos íons fosfato para Fusarium oxysporum

Para verificar a influência dos íons fosfato no crescimento do fungo filamentoso, bem como na produção de etanol pelo mesmo, foi utilizado um meio básico, constituído de:

<u>D</u> -xilose	1,0g%
Extrato de levedura	0,1g%
Solução de Vogel	0,5ml%
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	100ml

A este meio foram adicionadas quantidades variáveis de  $H_3PO_4$  xaroposo a 85%, de modo a obter em cada cultivo uma concentração final em  $H_3PO_4$  (v/v) de: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25%.

Todos os meios de cultivo tiveram seu pH corrigido para 4,0 com  $NH_4OH$  a 10% (v/v), tendo sido feito paralelamente um experimento controle, sem a adição de  $H_3PO_4$ .

#### 2.5.5.1.3. Determinação do pH ótimo para a levedura Pachyso- len tannophilus

Na experiência para determinar o pH ótimo de crescimento e/ou produção de etanol por esta levedura, foi usado um meio de cultivo constituído de:

<u>D</u> -xilose	3,0g%
Extrato de levedura	0,1g%
Solução de Vogel	0,5ml%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 85%	0,25ml%

Ao mesmo, foram adicionadas quantidades variáveis de NH<sub>4</sub>OH a 10% (v/v), de modo a corrigir o pH dos mesmos a 1,0 ; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0.

#### 2.5.5.1.4. Determinação do pH ótimo para Candida shehatae

Na experiência para determinar o pH ótimo de crescimento e/ou produção de etanol por esta levedura, foi usado um meio constituído de:

<u>D</u> -xilose	2,0g%
Extrato de levedura	0,5g%
Solução de Vogel	0,5ml%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 85%	0,25ml%

Ao mesmo, foram adicionadas quantidades variáveis de NH<sub>4</sub>OH a 10% (v/v), de modo a corrigir o pH dos mesmos a 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 e 5,5.

#### 2.5.5.1.5. Determinação do pH ótimo para Fusarium oxysporum

Para determinar o pH ótimo de crescimento e/ou produção de etanol pelo fungo filamentoso, foi utilizado um meio de cultivo constituído de:

<u>D</u> -xilose	3,0g%
Extrato de levedura	0,1g%
Solução de Vogel	0,5ml%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 85%	0,25ml%

Ao mesmo, foram adicionadas quantidades variáveis de NH<sub>4</sub>OH a 10% (v/v), de modo a corrigir o pH dos mesmos a 1,0 ; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0.

#### 2.5.5.1.6. Efeito dos íons cloreto e sulfato para Pachysolen tannophilus e Fusarium oxysporum



Visando avaliar a influência de íons cloreto e sulfato no crescimento da levedura Pachysolen tannophilus e do fungo Fusarium oxysporum, foi preparado um meio básico constituído de:

<u>D</u> -xilose	3,0g%
Extrato de levedura	0,1g%
Solução de Vogel	0,5ml%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 85%	0,25ml%

Aos mesmos, foram adicionadas quantidades variáveis de cloreto de amônia e/ou sulfato de amônia, de modo a obter nos cultivos, concentrações finais de cloretos e sulfatos de 0,01; 0,025 e 0,05g%, após o que o pH dos mesmos foi corrigido para 5,0 no caso da levedura Pachysolen tannophilus e para 3,5 para o fungo Fusarium oxysporum.

Cultivos ensaiados:

- a) Meio básico
- b) Meio básico + [Cl]<sup>-</sup> 0,01g%
- c) Meio básico + [Cl]<sup>-</sup> 0,025g%
- d) Meio básico + [Cl]<sup>-</sup> 0,05g%
- e) Meio básico + [SO<sub>4</sub>]<sup>=</sup> 0,01g%
- f) Meio básico + [SO<sub>4</sub>]<sup>=</sup> 0,025g%
- g) Meio básico + [SO<sub>4</sub>]<sup>=</sup> 0,05g%
- h) Meio básico + [SO<sub>4</sub>]<sup>=</sup> 0,025g% + [Cl]<sup>-</sup> 0,025g%

Todos os cultivos tiveram seu pH corrigido para 4,0 com NH<sub>4</sub>OH a 10% (v/v).

Todos os meios para fermentação preparados com descrição em 2.5.5.1., foram esterilizados sob vapor fluente durante 30 minutos.

2.5.5.2. Experimentos fermentativos onde foram utilizados os hidrolisados fosfóricos, como fonte de carbono.

2.5.5.2.1. Efeito da suplementação de hidrolisados ácidos de bagaço de cana, com solução de sais minerais e diferentes fontes de nitrogênio, na fermentação com Pachysolen tannophilus e Fusarium oxysporum

Hidrolisados ácidos de bagaço de cana (umidade = 3,34%; relação  $H_3PO_4$  0,5% (v/v) : bagaço = 1:10; 2,25 atm durante 2 horas), após resfriamento à temperatura ambiente foram filtrados em funil de placa porosa M. Após a determinação de seu conteúdo em CT e CR, parte dos mesmos foi concentrada 2 vezes e 4 vezes em aparelho rotavapor a 70°C, servindo de base para os cultivos, em seguida preparados:

- a) Hidrolisado direto (controle)
- b) Hidrolisado + solução de Vogel 0,5ml%
- c) Hidrolisado + extrato de levedura 0,1g%
- d) Hidrolisado + extrato de levedura 0,1g% + Vogel 0,5ml%
- e) Hidrolisado + extrato de levedura 0,1g% + Vogel 0,5ml% + uréia 0,1g%
- f) Hidrolisado + Vogel 0,5ml% + peptona Bioferm 0,1g%
- g) Hidrolisado 2 vezes concentrado + Vogel 0,5ml%
- h) Hidrolisado 2 vezes concentrado + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,1g%
- i) Hidrolisado 2 vezes concentrado, extraído com  $CHCl_3$  + Vogel 0,5ml%.

Todos os cultivos tiveram seu pH corrigido para 4,0 com  $NH_4OH$  a 10% (v/v).

2.5.5.2.2. Efeito da suplementação de hidrolisados ácidos de serragem de Pinus com solução de sais minerais e extrato de levedura, na fermentação com Pachysolen tannophilus

Hidrolisados de serragem de Pinus (umidade=10,98%; relação  $H_3PO_4$  0,5% (v/v) : serragem = 1:8; 2 atm durante 2 horas), após resfriamento à temperatura ambiente, foram filtrados em funil de placa porosa M. Após a determinação do seu

conteúdo em CT e CR, foram preparados os seguintes cultivos:

- a) Hidrolisado direto (controle)
- b) Hidrolisado + solução Vogel 0,5ml%
- c) Hidrolisado + extrato de levedura 0,1g%
- d) Hidrolisado + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,1g%
- e) Hidrolisado + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,3g%

Todos os cultivos tiveram seu pH corrigido para 4,0 com  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10% (v/v).

#### 2.5.5.2.3. Influência da idade do inóculo de Pachysolen tannophilus, na fermentação de hidrolisados ácidos de serragem de Pinus

Foi usado como meio básico, filtrado límpido de hidrolisado de Pinus (umidade=10,98%; relação  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5% (v/v) : serragem = 1:8; 2 atm durante 2 horas e 30 minutos), com o qual foram preparados cultivos de 50ml, aos quais foram adicionados solução de Vogel 0,5ml% e extrato de levedura 0,1g%. Após a -juste do pH para 4,0 com  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10% (v/v) e esterilização sob vapor fluente durante 30 minutos, seguida de resfriamento, cada um dos cultivos foi inoculado com culturas de Pachysolen tannophilus de 24, 48, 72 e 96 horas, em volume suficiente de modo a obter em todos eles, densidade ótica inicial equivalente.

##### 2.5.5.2.3.1. Verificação da presença de xilitol nos fermentados

Do fermentado do cultivo que foi inoculado com a cultura de 96 horas, tomaram-se amostras em duplicata dos tempos 32, 55 e 96 horas. Uma série foi reduzida e acetilada como descrito em 2.2.2.2.1.1. e a outra, apenas acetilada.

Todas foram analisadas por g.l.c. e comparadas com padrões de açúcares na forma de acetatos de alditóis e padrões simplesmente acetilados.

#### 2.5.5.2.4. Influência da pressão empregada durante a hidrólise ácida de serragem de Pinus, na capacidade fermentativa da levedura Pachysolen tannophilus

Foram usados como meio básico, filtrados límpidos de hidrolisados de Pinus (umidade=11,04%; relação  $H_3PO_4$  0,5% (v/v) : serragem = 1:5) obtidos a 2 atm durante 2 horas e 30 minutos e a 6 atm durante 1 minuto.

Alíquotas de 50ml dos mesmos, foram adicionadas de solução de Vogel e fontes de nitrogênio em concentrações variáveis (1/10, 3/10 e 5/10 da fonte de carbono presente) como especificado abaixo:

- a) Hidrolisado 2 atm + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,15g%
- b) Hidrolisado 2 atm + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,45g%
- c) Hidrolisado 2 atm + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,75g%
- d) Hidrolisado 2 atm + Vogel 0,5ml% + peptona 0,15g%
- e) Hidrolisado 2 atm + Vogel 0,5ml% + peptona 0,45g%
- f) Hidrolisado 2 atm + Vogel 0,5ml% + peptona 0,75g%
- g) Hidrolisado 6 atm + Vogel 0,5ml% + extrato de levedura 0,15g%
- h) hidrolisado 6 atm + Vogel 0,5ml% + peptona 0,15g%

Todos os cultivos tiveram seu pH corrigido para 4,0 com  $NH_4OH$  a 10% (v/v).

##### 2.5.5.2.4.1. Verificação do perfil de consumo de açúcares

Amostras de 0, 24, 33 e 48 horas do cultivo g do experimento anterior, tiveram seu conteúdo em açúcares determinado qualitativamente por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis, para verificar o consumo de qual açúcar ocorre preferencialmente e em que ordem os diversos componentes monossacáridicos são metabolizados.

##### 2.5.5.2.5. Comparação da habilidade fermentativa das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, em soluções de D-xilose p.a. ou hidrolisados ácidos de bagaço de cana e serragem de Pinus

Foram usados como meios básicos:

- a) Solução de D-xilose 4,5g%.
- b) Filtrado límpido de hidrolisado de bagaço de cana (umidade= 5,39%; relação  $H_3PO_4$  0,125% v/v : bagaço = 1:8; 10 atm), duas vezes concentrado.
- c) Filtrado límpido de hidrolisado de serragem de Pinus (umidade=9,16%; relação  $H_3PO_4$  0,125% v/v : serragem = 1:5; 10 atm) duas vezes concentrado.

Alíquotas de 50ml dos meios assim obtidos, foram enriquecidas com solução de Vogel 0,5ml% e extrato de levedura 0,1 g% e tiveram o seu pH corrigido para 4,0 com  $NH_4OH$  a 10% (v/v).

2.5.5.2.6. Comparação da habilidade fermentativa das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2 , Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, em hidrolisados ácidos de bagaço de cana, clarificados de compostos fenólicos

Foi utilizado como meio básico, hidrolisado de bagaço de cana (umidade=9,46%; relação  $H_3PO_4$  0,125% v/v : bagaço = 1:5; 10 atm). Após resfriamento e filtração em funil de placa porosa M, alíquotas dos filtrados límpidos duas vezes concentradas, foram extraídas com:

- a) Carvão ativo durante 20 minutos sob agitação, seguido de filtração em papel de filtro pregueado.
- b) Um volume de  $CHCl_3$ , após neutralização dos hidrolisados a pH 4,0 , durante 10 minutos, sob agitação ocasional em funil de separação. Após este intervalo de tempo, a fase aquosa foi separada por decantação.

A alíquotas de 50ml do hidrolisado sem tratamento prévio, tratado com carvão ativo e com clorofórmio, respectivamente, foram adicionadas solução de Vogel 0,5ml% e extrato de levedura 0,1g%. O pH dos cultivos foi corrigido para 4,0 com  $NH_4OH$  a 10% (v/v).

## 2.6. SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

### 2.6.1. Sacarificação enzimática de bagaços de cana e de sorgo , previamente clorados

O resíduo celulósico obtido após a hidrólise fosfórica de bagaços de cana e de sorgo, previamente clorados, como descrito em 2.4.8., foi extensivamente lavado com água destilada para completa eliminação dos açúcares (fenol-sulfúrico negativo).

Alíquotas de 2g do bagaço úmido contendo entre 75-85 % de umidade, foram colocadas em Erlenmeyer de 25ml e adicionadas de 10ml de uma solução de celulase Bioferm a 13mg/ml (1FPU/ml) em tampão citrato 0,05M , pH 4,8 e 3 gotas de tolueno (156). O recipiente foi vedado com rólha de borracha e incubado a 45°C em shaker de movimento rotatório a 150rpm, acompanhando-se a hidrólise enzimática através da dosagem de CR no sobrenadante do enzimolizado, em amostras retiradas em tempos diversos.

### 2.6.2. Influência do grau de umidade do bagaço hidrolisado, na posterior sacarificação enzimática

O resíduo obtido após solvólise e hidrólise fosfórica ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2,0 atm.; 2 horas e 30 minutos), foi extensivamente lavado com água destilada e alíquotas de 2g dos mesmos foram incubadas como descrito em 2.6.1., após terem sido submetidas aos seguintes tratamentos:

- a) Bagaço hidrolisado úmido (75 - 85% umidade)
- b) Bagaço hidrolisado secado em estufa a 140°C durante 1 hora
- c) Bagaço hidrolisado extraído com 10ml de clorofórmio e secado em estufa a 140°C durante 1 hora.

### 2.6.3. Inibição da sacarificação enzimática pelo carboidrato redutor liberado

As amostras a e c do experimento anterior, após sacarificação durante 60 horas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm. No sobrenadante límpido procedeu-se a de-

terminação usual de CR e o bagaço residual, após lavagem por 2 vezes com água destilada, foi incubado com nova e igual quantidade de enzima.

Após 96 horas de reincubação a 45°C, o mesmo procedimento foi repetido, fazendo-se uma segunda reincubação por mais 96 horas. Nos sobrenadantes límpidos, foi determinado o poder redutor.

#### 2.6.4. Sacarificação enzimática de bagaço de cana e de sorgo solvolisados, hidrolisados ou hidrolisados após solvólise prévia.

Bagaço de cana (umidade = 9,93%) e de sorgo (umidade = 6,65%) foram submetidos a solvólise e hidrólise fosfórica (relação  $H_3PO_4$  0,5% v/v : bagaço = 1 : 10; 2 horas; 2,5 atm). Após resfriamento, os solvolisados e hidrolisados foram filtrados em funil de placa porosa M e os resíduos lignocelulósicos, lavados exaustivamente com água destilada. O resíduo solvolisado, foi em seguida hidrolisado nas mesmas condições, resfriado e filtrado, seguindo-se diversas lavagens do mesmo com água destilada.

Usando-se os resíduos lignocelulósicos como especificado abaixo, foram feitas sacarificações enzimáticas da maneira descrita em 2.6.1.

- a) Bagaço de cana solvolisado
- b) Bagaço de cana hidrolisado
- c) Bagaço de cana solvolisado e hidrolisado
- d) Bagaço de sorgo solvolisado
- e) Bagaço de sorgo hidrolisado
- f) Bagaço de sorgo solvolisado e hidrolisado

Durante 96 horas foram retiradas amostras para dosagem de CR (como D-glucose) .

#### 2.6.5. Sacarificação enzimática de bagaço de cana residual após hidrólise fosfórica na câmara de combustão de Parr.

O resíduo celulósico obtido após solvólise e hidrólise fosfórica de bagaço de cana em câmara de combustão de Parr (0,0625% de  $H_3PO_4$  v/v) e temperaturas variáveis de 170, 185 e 200°C ou temperatura constante de 170°C e concentrações variáveis de  $H_3PO_4$  (0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% v/v), foi extensivamente lavado com água destilada e alíquotas de 2g dos mesmos foram submetidas à sacarificação enzimática como descrito em 2.6.1.

##### 2.6.5.1. Determinação qualitativa dos açúcares

A determinação qualitativa da composição em açúcares da amostra final (62 horas) do experimento anterior, foi feita por cromatografia em papel como descrito em 2.2.2.1.



## RESULTADOS

1. Influência da relação biomassa residual : ácido diluído, na hidrólise fosfórica de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas e 30 minutos).

O volume de solução ácida diluída a ser usado na hidrólise fosfórica foi determinado, variando-se o mesmo de 6 a 10 vezes o peso da serragem a ser hidrolisada.

Os resultados da tabela I, mostram que não há diferença significativa na liberação de carboidratos redutores, quando se aumenta a respectiva relação de 6 : 1 para 10 : 1 (v/p).

Além disso, o grau de pulverização (comparando-se a serragem 40 mesh com a 20 mesh), não tem influência efetiva sobre a hidrólise ácida, uma vez que o poder redutor liberado apresentou valores bem próximos, mantendo-se em torno de 1,1g%, quando estas duas variantes de resíduos foram submetidas à hidrólise, numa relação serragem :  $H_3PO_4$  0,5% v/v de 1 : 10.

2. Potencial do  $H_3PO_4$  diluído, como alternativa para hidrolisar pentosanas.

Com a finalidade de caracterizar o potencial do ácido proposto para hidrolisar pentosanas, relativamente aos ácidos classicamente descritos na literatura (clorídrico e sulfúrico), foi realizado um processo comparativo de hidrólise, com uma concentração de catalisador de 0,5% p/v, todos atuando na mesma condição de aquecimento (2 atmosferas; 2 horas), mantendo-se ainda uma relação bagaço : solução ácida diluída de 1 : 10 p/v.

TABELA I - Influência da relação biomassa residual : ácido diluído, na hidrólise fosfórica de serragem de Pinus com  $H_3PO_4$  a 0,5% v/v a 2 atmosferas, durante 2 horas e 30 minutos.

Granulometria		Relação biomassa : ácido diluído	CT*	CR*
Mesh	d.i. (mm)			
40	0,420	1 : 6	1,13	1,07
40	0,420	1 : 7	1,13	1,08
40	0,420	1 : 8	1,20	1,14
40	0,420	1 : 9	1,18	1,13
40	0,420	1 : 10	1,09	1,07
20	0,841	1 : 10	1,16	1,15

Experiência realizada como descrito no item 2.4.1. de Materiais e Métodos.

\* Os valores de CT e CR estão expressos em termos de g/100ml de solução hidrolisada límpida.

A avaliação da eficiência da hidrólise foi acompanhada através da liberação de açúcares simples a partir das pentosas de bagaço de cana e de sorgo.

Os dados da tabela II, mostram que para a cana, os valores obtidos para a hidrólise fosfórica foram de 89,5% e 96,9% daqueles logrados com a hidrólise clorídrica e sulfúrica, respectivamente.

Os valores equivalentes para o sorgo, foram menores, na ordem de 83,82% e 80,28%.

A solvólise ou auto-hidrólise (aquecimento do bagaço em água destilada), como controle, não mostra rendimentos quantitativamente significativos, mas no aspecto qualitativo cobra importância, por ser o açúcar preferencialmente liberado, a L-arabinose.

Em outras palavras, se a solvólise precede a hidrólise ácida, o hidrolisado final aparecerá livre desta pentose e tecnicamente, mais enriquecido em D-xilose (Figura 9).

Finda a hidrólise, o potencial hidrogeniônico inicial aparece alterado, e os valores medidos nos filtrados límpidos também constam da tabela II.

### 3. Força destrutiva de ácidos minerais

A obtenção de derivados de açúcares por desidratação, catalisada por ácidos, pode ser de interesse comercial, como por exemplo, o furfural a partir de pentoses e o hidróximetilfurfural a partir de hexoses. Por outro lado, a formação destes derivados como subprodutos, quando se visa os monossacarídeos, é indesejável, tanto pela perda do produto principal, quanto pela ação nociva que podem ter na etapa seguinte de fermentação.

Através da análise dos filtrados límpidos dos hidrolisados ácidos do experimento anterior, por g.l.c. em coluna de Porapak Q, comparativamente à um padrão de furfural, evidencia-se que nas condições empregadas, o  $H_2SO_4$  foi o mais destrutivo e o  $H_3PO_4$ , como o menos inconveniente na geração de furfu

TABELA II - Potencial do  $H_3PO_4$  como alternativa de hidrólise para pentosanas.

Resíduo	Tratamento	pH	CT	CR
Cana	Solvólise	4,07	0,44	0,024
Cana	Hidrólise fosfórica	1,58	2,03	1,87
Cana	Hidrólise clorídrica	0,99	2,00	1,93
Cana	Hidrólise sulfúrica	1,03	2,16	2,09
Sorgo	Solvólise	4,73	0,38	0,078
Sorgo	Hidrólise fosfórica	1,73	2,03	1,71
Sorgo	Hidrólise clorídrica	1,02	2,10	2,04
Sorgo	Hidrólise sulfúrica	1,05	2,23	2,13

Os bagaços de cana e de sorgo foram hidrolisadas com os referidos ácidos, numa concentração de 0,5% p/v durante 2 horas a 2 atmosferas, estando os valores de CT e CR expressos em termos de g/100ml de solução hidrolisada límpida.

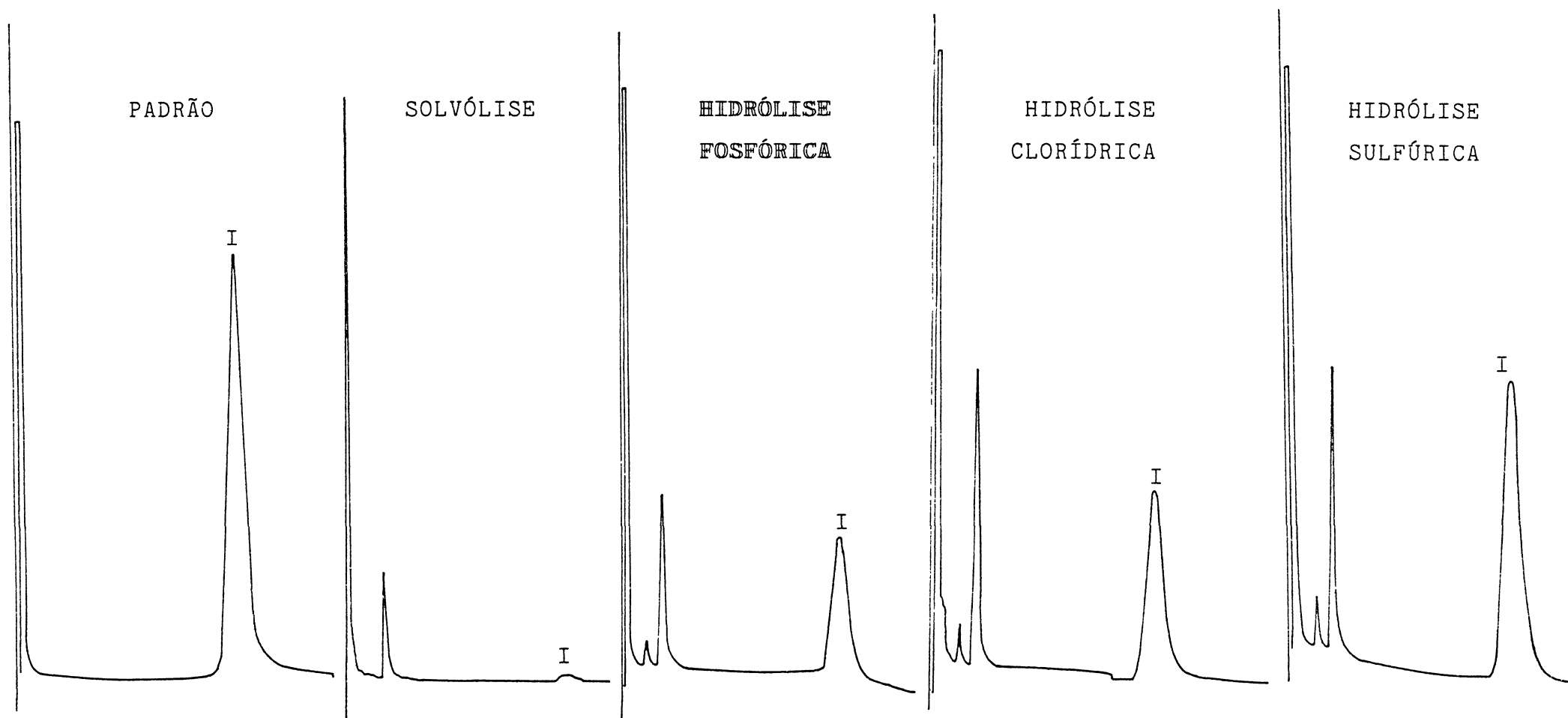


FIGURA 8: Avaliação da quantidade de furfural formada durante a solvólise e hidrólise fosfórica, clorídrica e sulfúrica (ácidos a 0,5% p/v; 2 atmosferas; 2 horas) por g.l.c. em coluna de Porapak Q à temperatura de 180°C.

I = Furfural.

TABELA III - Reverificação da eficiência da hidrólise fosfórica.

Resíduo	Tratamentos efetuados			CT *	CR *
	Solvólise	Hidrólise	Re-hidrólise		
Cana	+	-	-	1,15	0,25
Cana	+	+	-	14,46	11,32
Cana	-	+	-	19,50	13,00
Cana	-	+	+	2,48	2,00
Sorgo	+	-	-	5,11	1,34
Sorgo	+	+	-	13,19	9,70
Sorgo	-	+	-	19,27	9,11
Sorgo	-	+	+	2,56	1,96

Experiência realizada como descrito no item 2.4.3 de Materiais e Métodos.

\* Os valores de CT e CR estão expressos em termos de g/100g de peso seco da biomassa hidrolisada.

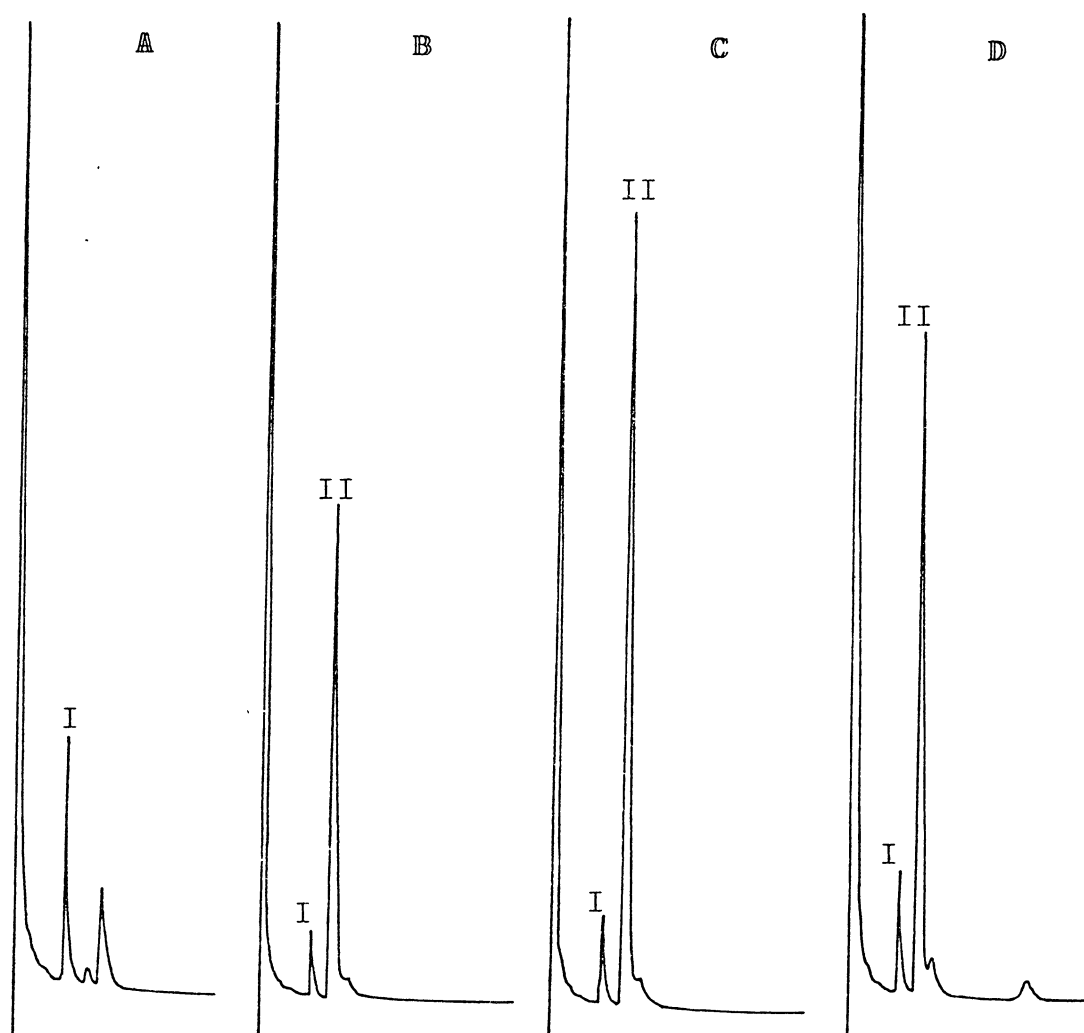


FIGURA 9: Composição em monossacarídeos de bagaço de cana e de sorgo, submetidos à solvólise e/ou hidrólise fosfórica ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas).

A = Bagaço de cana solvolisado.

B = Bagaço de cana hidrolisado.

C = Bagaço de cana solvolisado e hidrolisado.

D = Bagaço de sorgo solvolisado e hidrolisado.

I = Arabinitol penta-O-acetato

II = Xilitol penta-O-acetato.

ral (Figura 8).

#### 4. Reverificação da eficiência da hidrólise fosfórica

Assumida a hidrólise fosfórica nas condições até aqui descritas, como seletiva para a fração de pentosanas, além da avaliação de carboidratos como poder redutor e total e análise cromatográfica de controle, levou-se a cabo a rehidrólise do bagaço residual, nas mesmas condições do primeiro ciclo de autoclavação.

Os dados da tabela III, mostram os resultados da hidrólise direta seguida de rehidrólise, comparativamente à solvólise (autohidrólise) seguida de hidrólise, de bagaços de cana e de sorgo.

A solvólise de bagaços de cana e de sorgo provoca a liberação de 0,25 e 1,34g% de açúcares redutores, aos quais se somam 11,32 e 9,70g%, respectivamente, quando os bagaços residuais são submetidos à hidrólise fosfórica.

Quando os bagaços hidrolisados com  $H_3PO_4$  foram submetidos à uma rehidrólise nas mesmas condições ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas), obtiveram-se valores de 2,00 e 1,96 g% de carboidratos redutores, respectivamente para a cana e o sorgo, valores que representam apenas 15,38 e 21,51% do liberado no primeiro ciclo de hidrólise.

Como derradeira confirmação, procedeu-se a uma análise mais refinada dos produtos de hidrólise. As soluções dos açúcares liberados, foram deionizadas, reduzidas a polióis, peracetiladas e analisadas em coluna de ECNSS-M.

Os picos do cromatograma da figura 9, corroboraram todas as informações anteriores: arabinitol é predominante na solvólise, xilitol na hidrólise fosfórica precedida de solvólise e xilitol acompanhado de menor proporção de arabinitol, na hidrólise fosfórica direta.



## 5. Avaliação de parâmetros cinéticos da hidrólise fosfórica

### 5.1. Efeito da concentração de $H_3PO_4$ e tempo de residência na liberação de CT e CR, durante a hidrólise de bagaço de sorgo, sob pressão constante de 2,5 atmosferas.

Os resultados das figuras 10-A e 10-B, indicam que operando com pressão constante de 2,5 atmosferas, não computados os tempos de atingimento da temperatura desejada e resfriamento ao término, pode-se obter valores muito próximos do máximo de liberação de pentoses com concentração bem reduzida de ácido (0,25 a 0,75% v/v), com 120 minutos de aquecimento.

Mesmo a redução deste tempo à metade (60 minutos), pode facultar resultados igualmente significativos. Tempo ainda mais reduzido de autoclavação (30 minutos), diminui a eficiência da depolimerização das pentosanas entre 2/3 e 3/4 dos anteriormente referidos, mas se a concentração de ácido é maior (1,00 a 1,25% v/v), mesmo com apenas 30 minutos de aquecimento, o rendimento da hidrólise final é apreciável.

Comparando-se as figuras 10-A e 10-B (medida de açúcares totais e redutores, respectivamente), a diferença mais claramente aparente nas curvas de 30 minutos, é facilmente explicável pela inspeção cromatográfica em papel da natureza química dos carboidratos liberados: xilo-oligossacarídeos além de D-xilose, os primeiros desdobrados no caso das curvas de 60 e 120 minutos, explicando também a quase coincidência das mesmas, em ambas as figuras.

### 5.1. Efeito da concentração de $H_3PO_4$ e pressões variáveis na liberação de CT e CR, durante a hidrólise de bagaço de sorgo, durante 1 hora.

Mantendo agora o tempo de residência na autoclave em 1 hora, pode-se constatar nas figuras 11-A e 11-B, que o efeito de pressões crescentes acarreta resultados similares àqueles já relatados para a variação do tempo de residência.

Pressões na faixa de 2,0 a 2,5 atmosferas (133 a 139°C)

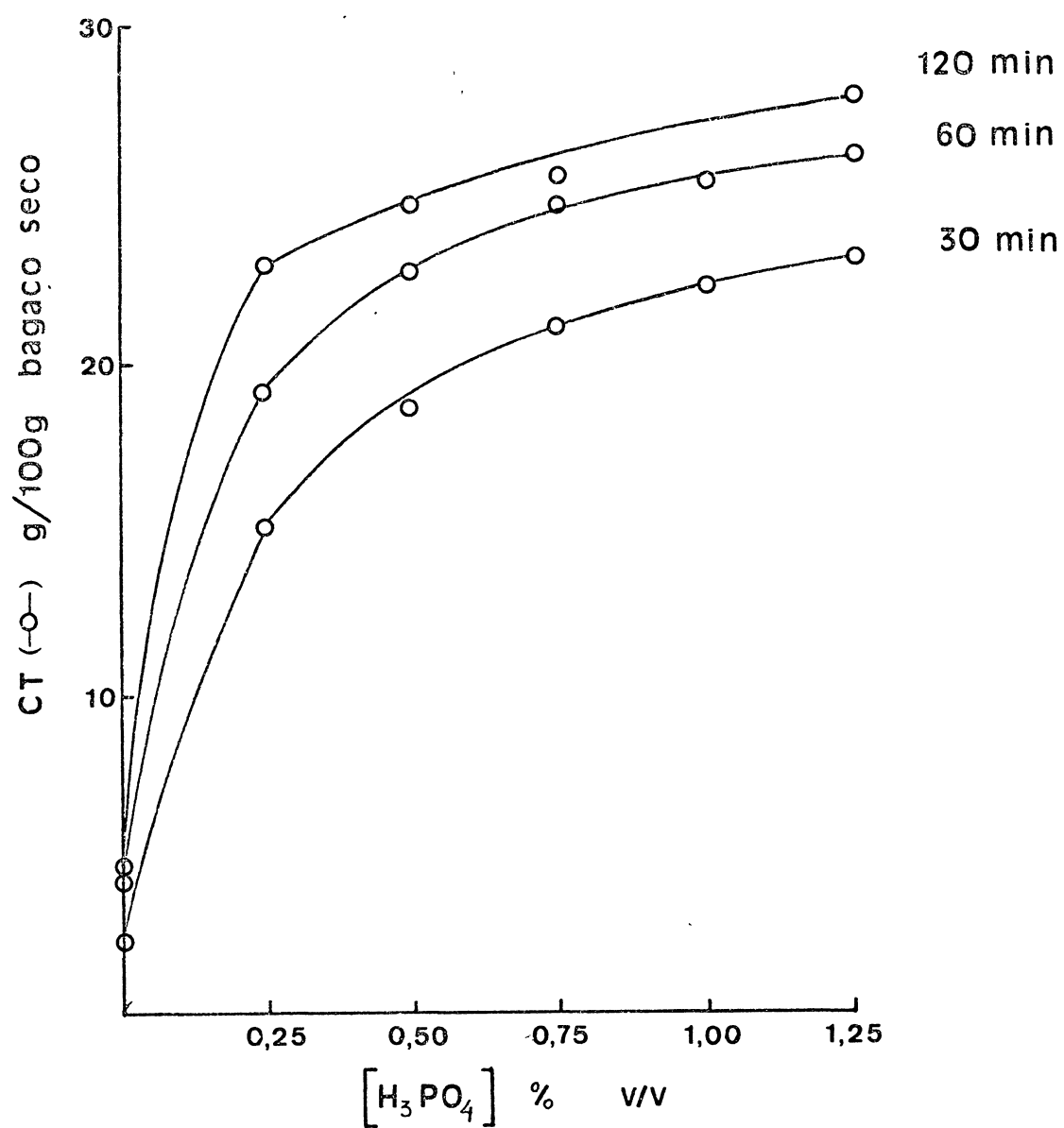


FIGURA 10-A: Efeito da  $[H_3PO_4]$  e tempo de residência na liberação de CT durante a hidrólise de bagaço de sorgo, sob pressão constante de 2,5 atmosferas.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.5.1. de Materi-  
ais e Métodos.

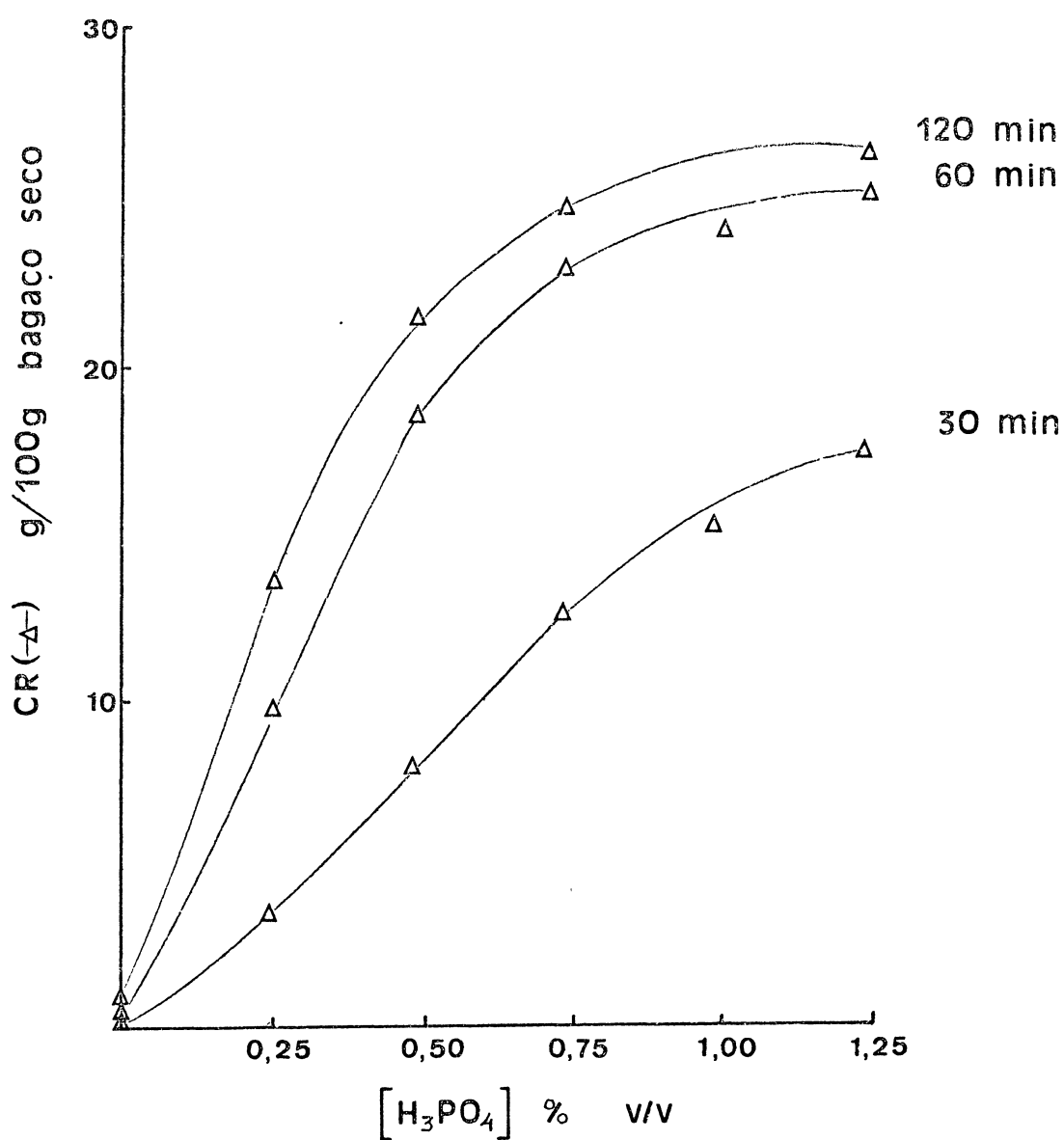


FIGURA 10-B: Efeito da  $[H_3PO_4]$  e tempo de residência na liberação de CR durante a hidrólise de bagaço de sorgo, sob pressão constante de 2,5 atmosferas.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.5.1. de Materiais e Métodos.

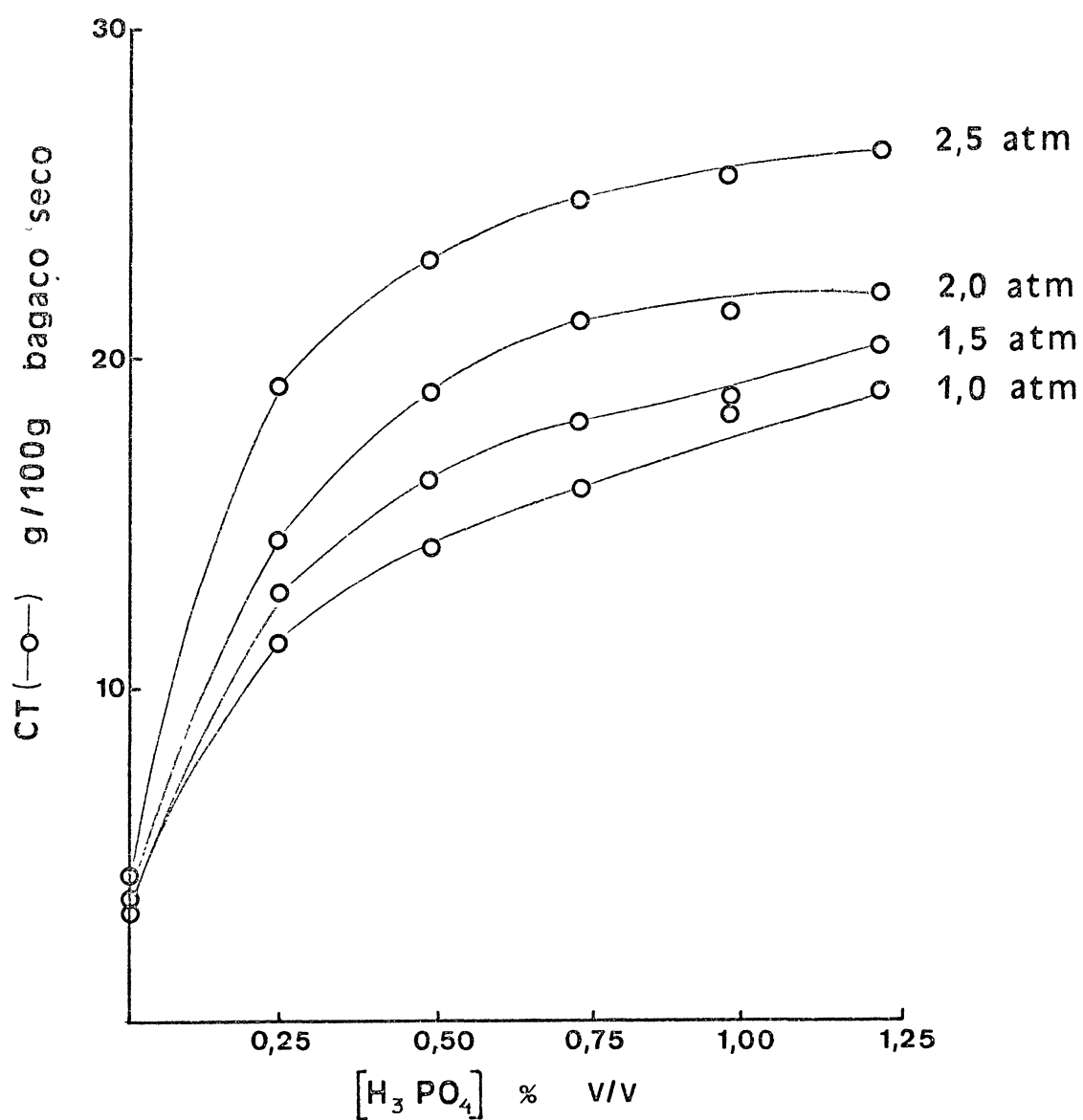


FIGURA 11-A: Efeito da  $[H_3PO_4]$  e pressões variáveis na liberação de CT durante a hidrólise de bagaço de sorgo, fixando-se o tempo de residência em 1 hora.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.5.2. de Materiais e Métodos.

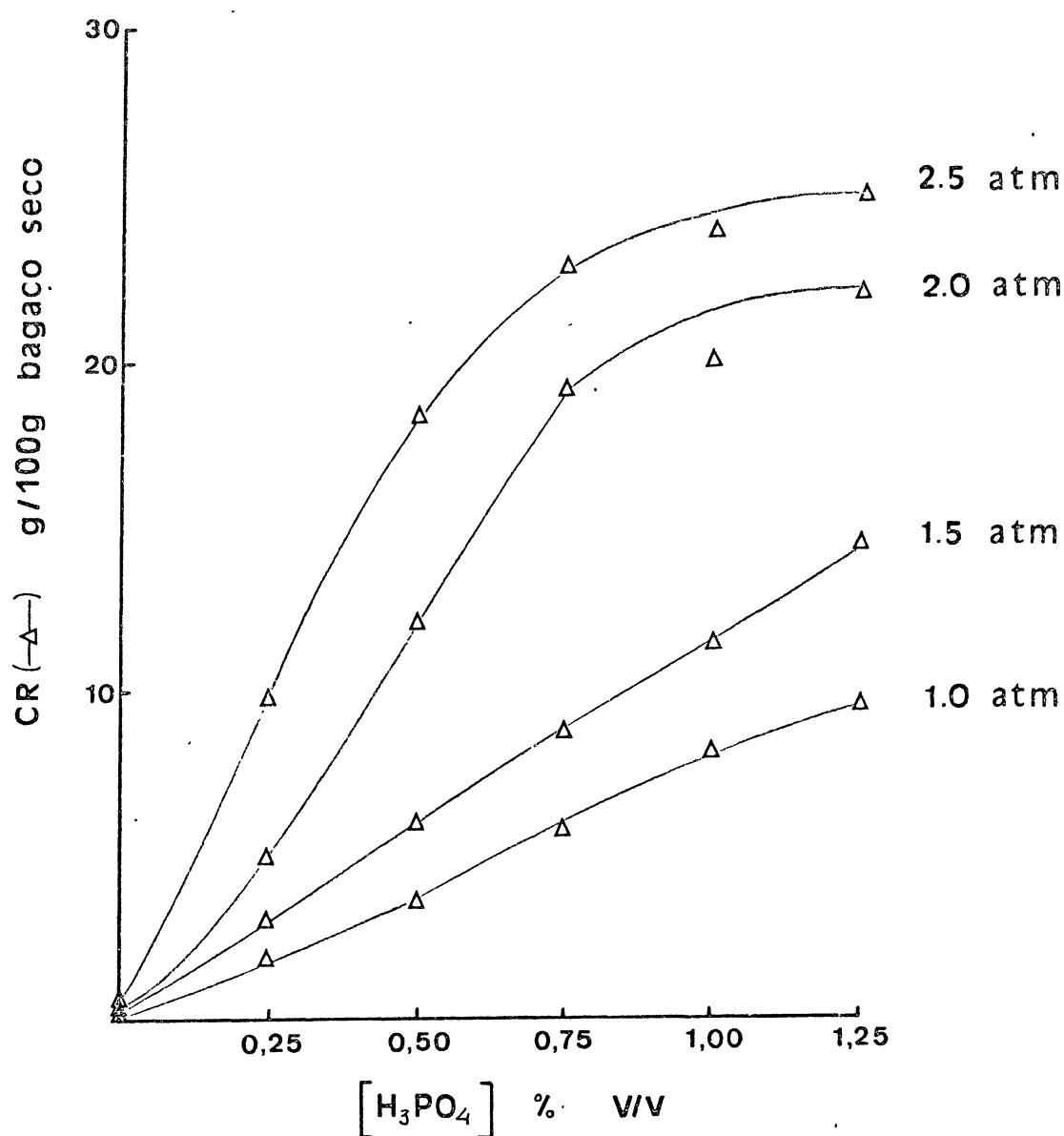


FIGURA 11-B: Efeito da  $[H_3PO_4]$  e pressões variáveis na liberação de CR durante a hidrólise de bagaço de sorgo, fixando-se o tempo de residência em 1 hora.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.5.2. de Materiais e Métodos.

proporcionam despolimerização completa das pentosanas.

### 5.3. Limite mínimo de catalisador

Não disponível até o momento, aparelhagem para condução de hidrólises em pressões mais elevadas (o que seria de importância e aplicação industrial mais aconselhável), procurou-se verificar até que ponto o emprego de temperaturas mais elevadas, poderia proporcionar hidrólise completa com consumo ainda menor de ácido fosfórico.

A alternativa foi o aquecimento em recipiente fechado (comparativamente à autoclave, que envolvia o contato direto da suspensão com a fase de vapor exógeno). Para isto, empregou-se a câmara de combustão de Parr.

Na figura 12, a manutenção da temperatura de 170°C por 60 minutos (não computados os 15 minutos de equilíbrio da temperatura), mostra claramente a conveniência do emprego de uma concentração menor de ácido (0,125 a 0,25% v/v), para que se atinja a quase completa despolimerização das pentosanas.

Conforme mostra a figura 13, mesmo uma redução da concentração do ácido fosfórico a 0,0625% v/v, permite hidrólise completa, desde que se mantenha o tempo de aquecimento (60 minutos), mas a temperatura seja elevada a 185°C.

## 6. Hidrólise fosfórica comparativa de Angiospermas (cana, sorgo e bracatinga) e Gimnospermas (Pinus).

Com o propósito de comprovar se a hidrólise fosfórica, até aqui descrita como seletiva para a fração de pentosanas de madeiras duras, também é eficiente na despolimerização da fração hemicelulósica de madeiras moles, realizaram-se solvólises e hidrólises fosfóricas comparativas entre as Angiospermas e Gimnospermas. As primeiras, representadas além da cana e do sorgo, pela bracatinga, e as últimas, pelo Pinus taeda.

A solvólise destes resíduos realizada a 3, 4, 5 e 6 atmosferas, está representada graficamente na figura 14.

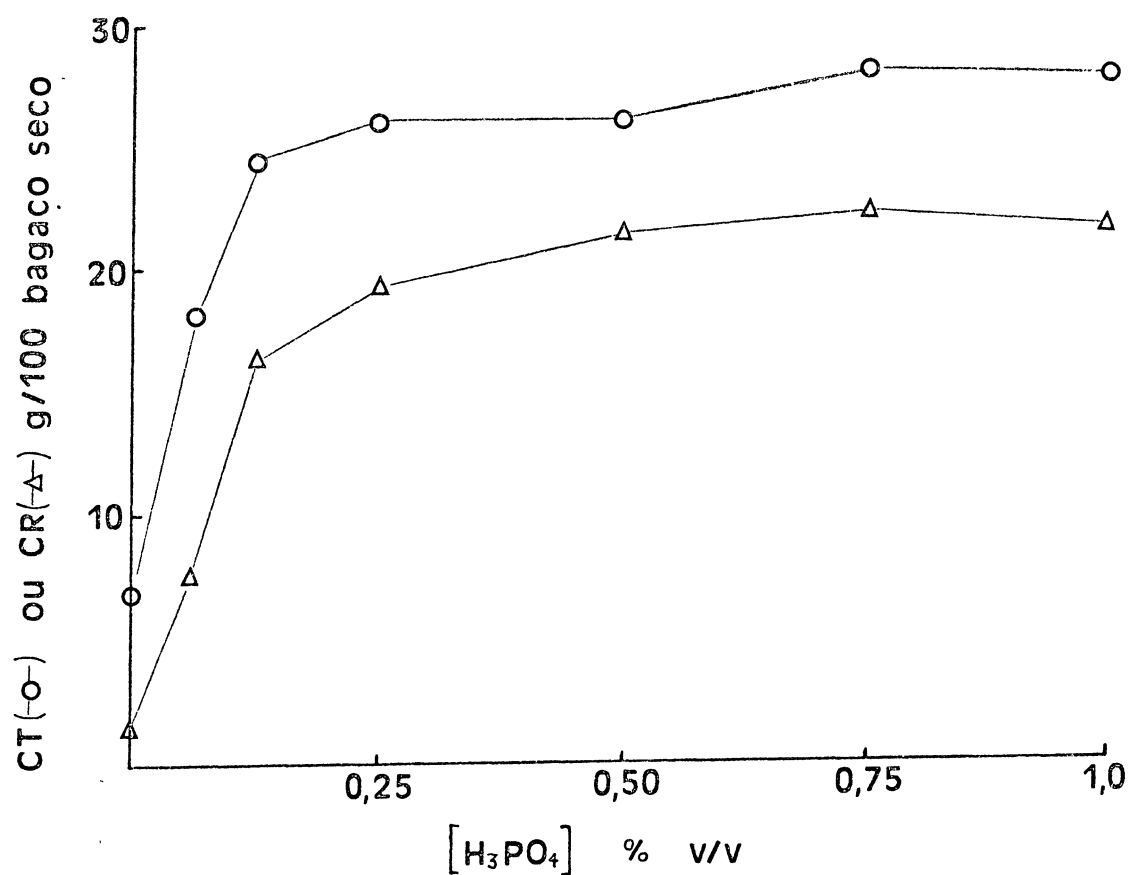


FIGURA 12: Efeito da  $[H_3PO_4]$  na hidrólise de bagaço de cana, sob temperatura ( $170^{\circ}C$ ) e tempo de residência (1 hora e 15 minutos) constantes.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.6.1. de Materiais e Métodos.

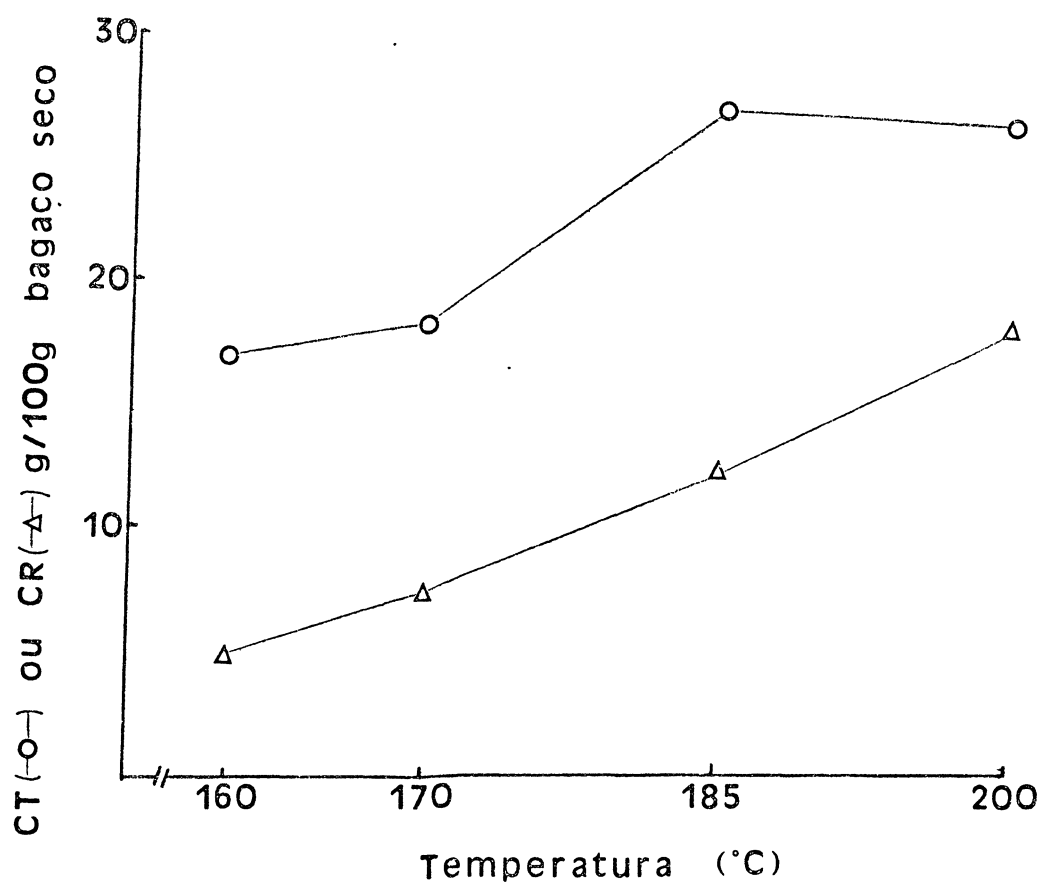


FIGURA 13: Efeito da temperatura na hidrólise de bagaço de cana, sob  $[H_3PO_4]$  (0,0625% v/v) e tempo de residência constantes.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.6.2. de Materiais e Métodos.



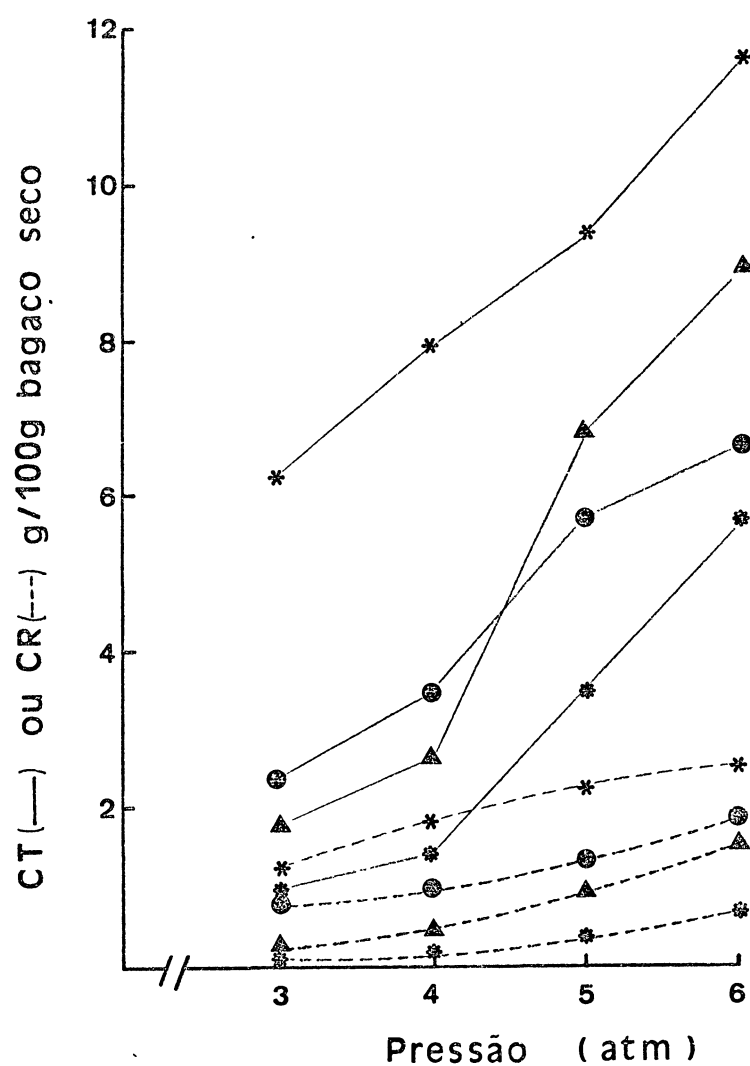


FIGURA 14: Solvólises comparativas de resíduos de Angiospermas: cana (▲), sorgo (\*) e bracatinga (✱) e Gimnospermas: Pinus (⊙), realizadas em reator sob pressões de 3, 4, 5 e 6 atmosferas.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.7. de Materiais e Métodos.

Ainda que ocorra solubilização de polissacarídeos, representada pelos valores de carboidratos totais, nestas condições, a liberação de carboidratos redutores é muito pequena, variando de 0,74g% para a bracatinga e chegando ao máximo de 2,60g% para o resíduo de sorgo.

A qualificação destes carboidratos redutores, na forma de seus acetatos de alditóis, foi feita por g.l.c., estando representado na figura 17 o perfil de monossacarídeos libera- dos durante a solvólise realizada a 6 atmosferas, onde mais u- ma vez se constata, que na solvólise, o açúcar preferencialmen- te liberado é a L-arabinose, seguido de proporções muito peque- nas de D-xilose.

Quando nos mesmos resíduos, se realizou a hidrólise com  $H_3PO_4$  a 0,1% v/v em pressões variáveis de 3, 4 e 5 atmosfe- ras, obtiveram-se as curvas da figura 15. Nestas condições, há uma maior solubilização de polissacarídeos, com aumento parale- lo da liberação de carboidratos redutores. Estes, representam do conteúdo total dos carboidratos liberados, 34% para a cana, 35% para a bracatinga, 42% para o sorgo e 60% para o Pinus.

Mantendo-se a pressão durante a hidrólise em 5 atmos- ras e aumentando-se a concentração de ácido para 0,25 e 0,50% v/v, há um incremento ainda maior na solubilização de polissa- carídeos, os quais são quase totalmente hidrolisados a seus res- pectivos componentes monoméricos (Figura 16).

Na hidrólise mais enérgica ( $H_3PO_4$  0,5% v/v), a libe- ração de carboidratos redutores foi de 15,37g% para o Pinus , 15,80g% para a bracatinga, 21,02g% para a cana e 23,43g% para o sorgo, valores estes que representam respectivamente, 100% ; 91,60% ; 96,00% e 94,30% do total de carboidratos presentes nos hidrolisados.

Mantendo-se agora a concentração de ácido em 0,5% v/v e aumentando-se a pressão para 6 atmosferas, consegue-se aumen- tar a liberação de poder redutor em apenas 1,175 vezes para a cana, 1,037 vezes para o sorgo, 1,186 vezes para a bracatin- ga e 1,038 vezes para o Pinus (Tabela IV).

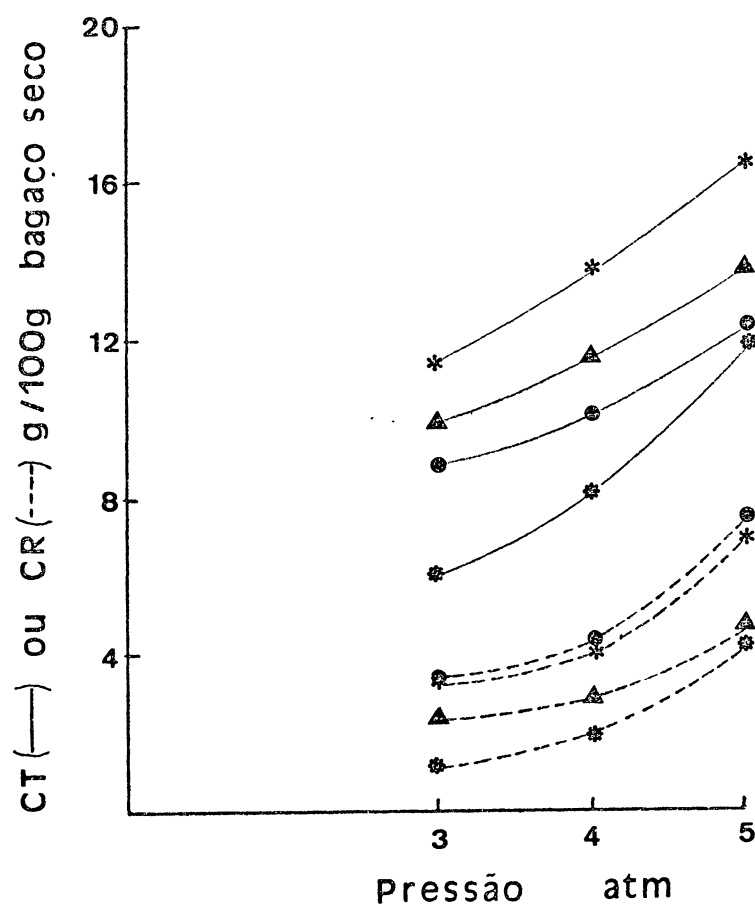


FIGURA 15: Hidrólise fosfórica comparativa de resíduos de Angiospermas: cana (▲), sorgo (\*) e bracatinga (#) e Gimnospermas: Pinus (●), realizadas com  $[H_3PO_4] = 0,1\%$  v/v e pressões de 3, 4 e 5 atmosferas.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.7. de Materiais e Métodos.

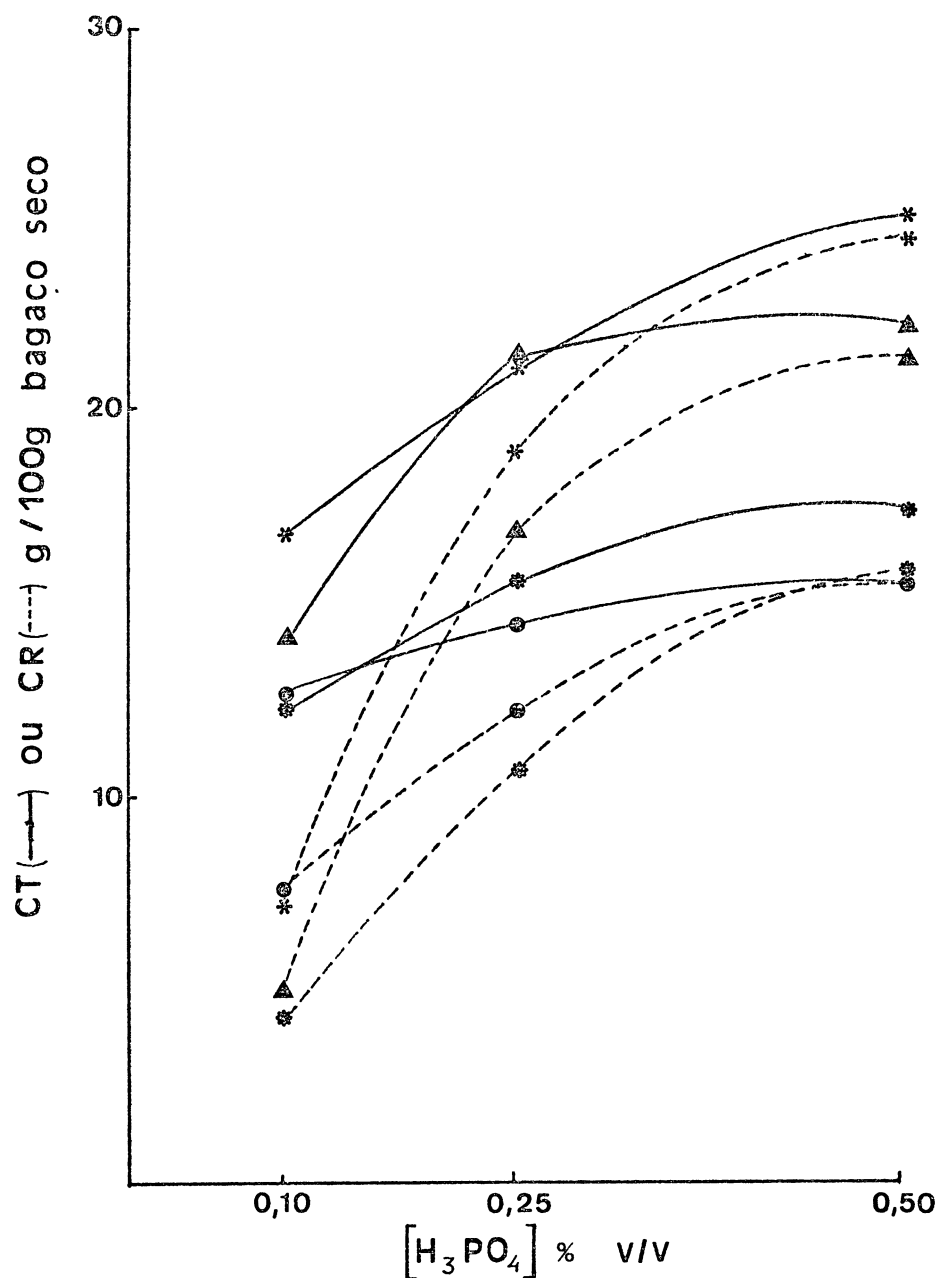


FIGURA 16: Hidrólise fosfórica comparativa de resíduos de Angiospermas: cana (▲), sorgo (\*) e bracatinga (✱) e Gimnospermas: Pinus (●), realizadas sob pressão de 5 atmosferas e concentrações de  $H_3PO_4$  de 0,1 ; 0,25 e 0,5% v/v.

Experiência realizada como descrito no item 2.4.7. de Materiais e Métodos.

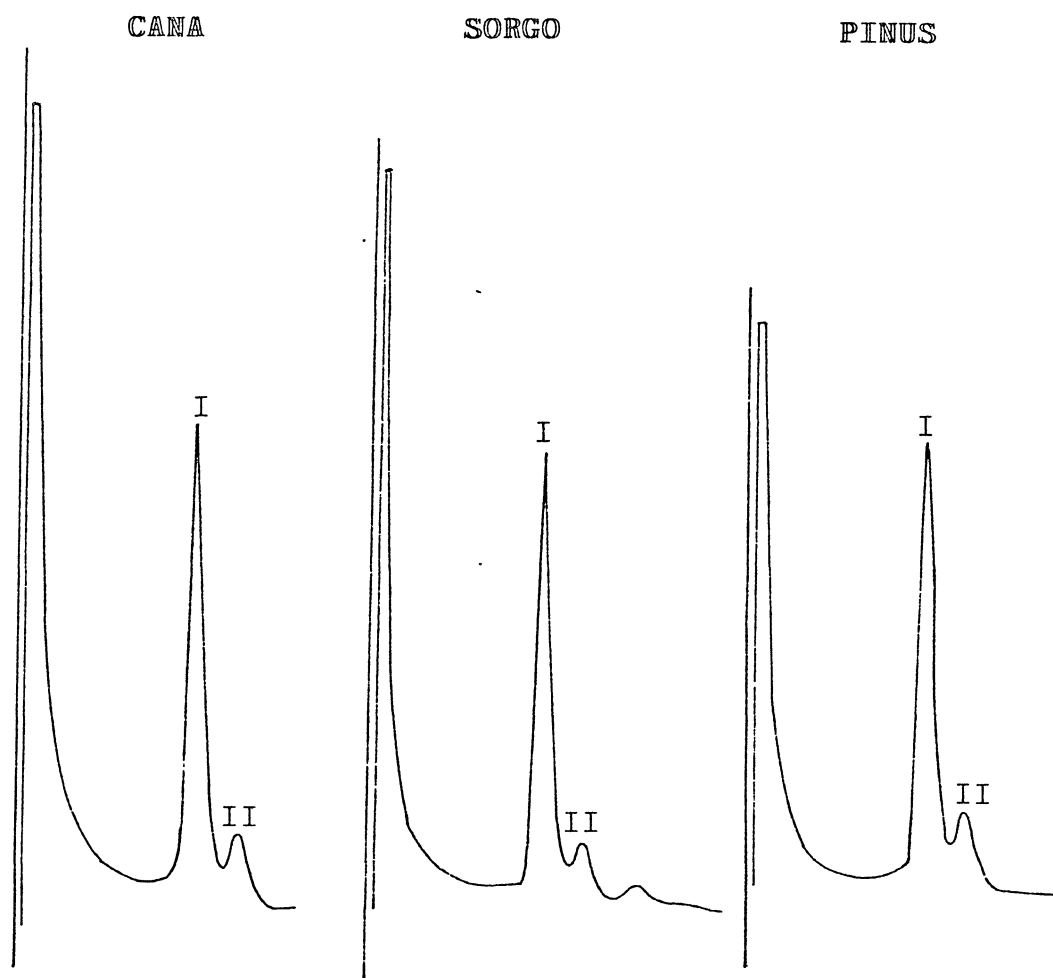


FIGURA 17: Análise por g.l.c. dos solvolisados (6 atm) de Angiospermas (cana e sorgo) e Gimnospermas (Pinus), na forma de seus acetatos de alditóis.

I = Arabinitol penta-O-acetato

II = Xilitol penta-O-acetato

TABELA IV - Hidrólise fosfórica comparativa de Angiospermas (cana, sorgo e bracatinga) e Gimnospermas (Pi - nus) com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 0,5% v/v e pressões de 5 e 6 atmosferas.

Resíduo	Pressão empregada	CT*	CR*
Cana	5 atmosferas	21,90	21,02
Cana	6 atmosferas	26,12	24,71
Sorgo	5 atmosferas	24,85	23,43
Sorgo	6 atmosferas	25,11	24,30
Bracatinga	5 atmosferas	17,24	15,80
Bracatinga	6 atmosferas	20,75	18,74
<u>Pinus</u>	5 atmosferas	15,37	15,37
<u>Pinus</u>	6 atmosferas	16,50	15,96

\* Os valores de CT e CR estão expressos em termos de g/100g de peso seco da biomassa hidrolisada.

A análise qualitativa dos açúcares liberados durante a hidrólise fosfórica a 0,5% v/v e 6 atmosferas de pressão, está representada na figura 18.

Os picos dos cromatogramas confirmam que, na hidrólise fosfórica direta, o açúcar liberado é a D-xilose no caso da bracinga, D-xilose acompanhada de pequena proporção de L-arabinose na depolimerização de bagaço de cana e de sorgo, e mais heterogeneamente, D-xilose acompanhada de L-arabinose, D-manose e D-galactose, no caso do processamento do Pinus.

## 7. Hidrólise fosfórica de bagaços clorados

Para verificar se a eficiência da hidrólise fosfórica até aqui obtida, podia ser aumentada, desde que uma etapa prévia de deslignificação fosse incluída no processo, realizou-se a hidrólise fosfórica de bagaços de cana e de sorgo, previamente clorados, seguidos ou não de extração da cloro-lignina formada.

Nos resultados da tabela V, evidencia-se que a cloração prévia do material, melhora o rendimento da hidrólise fosfórica subsequente.

Quando a amostra clorada não é submetida à extração com etanol fervente e etanolamina a 3% em etanol fervente antes da hidrólise, consegue-se após a mesma, valores de carboidratos redutores de 2,37g% para a cana e 2,06g% para o sorgo, valores 1,64 e 1,85 vezes superiores aos da amostra não clorada, processada nas mesmas condições.

Quando a cloro-lignina formada é extraída do resíduo lignocelulósico antes da hidrólise fosfórica do mesmo, o rendimento da liberação de poder redutor ainda aumenta: 1,84 vezes para a cana e 1,73 vezes para o sorgo, em relação à amostra não clorada submetida ao mesmo tratamento, porém a concentração de carboidratos redutores no filtrado límpido do hidrolisado é menor do que aquela obtida quando a cloração não é seguida de extração.

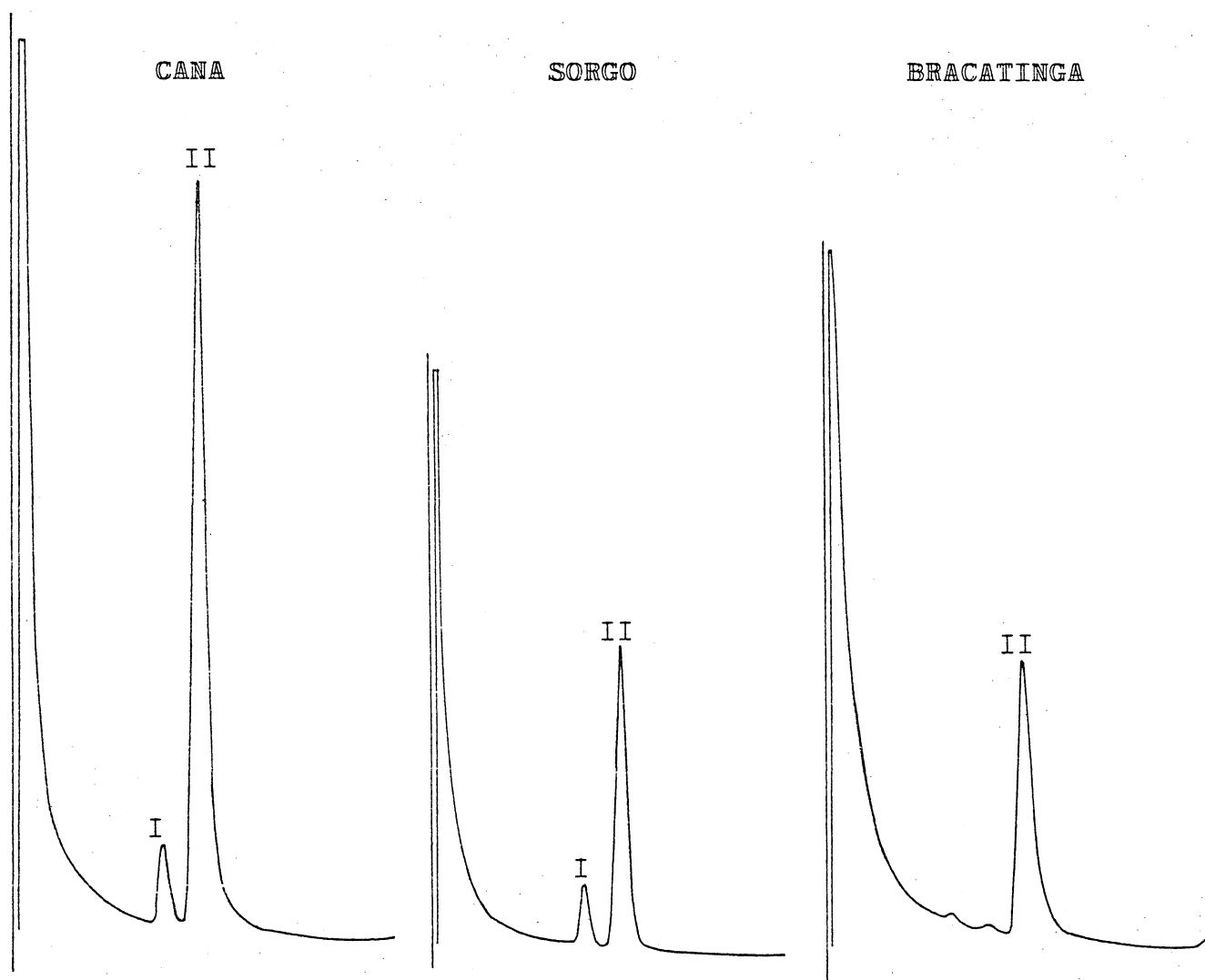


FIGURA 18: Análise por g.l.c. dos hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$  a 0,5% v/v nospermas, na forma de seus acetatos de alditóis.

I = Arabinitol penta-O-acetato; II = Xilitol penta-O-acetato; III = Galactitol hexa-O-acetato e V = Glucitol hexa-O-acetato.



TABELA V - Hidrólise fosfórica ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 0,5% v/v; 2 atmosferas; 1 hora) de bagaço de cana e de sorgo, previamente clorados.

Resíduo	Solvólise	Hidrólise fosfórica	Cloração	Extração da cloro-lignina	CT	CR	pH
Cana	+	-	-	-	0,55	0,00	3,81
Cana	-	+	-	-	2,08	1,44	1,67
Cana	-	+	-	+	1,75	0,97	1,71
Cana	-	+	+	-	2,79	2,37	0,94
Cana	-	+	+	+	2,29	1,79	1,51
Sorgo	+	-	-	-	0,52	0,04	4,24
Sorgo	-	+	-	-	1,96	1,11	1,75
Sorgo	-	+	-	+	1,82	0,96	1,76
Sorgo	-	+	+	-	2,46	2,06	1,02
Sorgo	-	+	+	+	2,29	1,67	1,60

A cloração das amostras, extração da cloro-lignina e hidrólise fosfórica do resíduo delignificado, foram realizadas conforme descrição nos itens 2.4.8.1., 2.4.8.2. e 2.4.8.3. de Materiais e Métodos e os valores de CT e CR estão expressos em termos de g/100ml de solução hidrolisada límpida.

Na mesma tabela, verifica-se que o pH dos hidrolisados das amostras cloradas apresentou-se diminuído, decréscimo este que é acentuado ainda mais quando a cloro-lignina não é extraída do resíduo a ser hidrolisado.

#### 8. Extração de hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana com clorofórmio, acetato de etila e carvão ativo.

Como os dados da figura 8 mostram claramente que, também durante a hidrólise fosfórica ocorre a desidratação das pentoses com formação de furfural, tratou-se os hidrolisados, após ajuste de seu pH para 4,0 com  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%, com um volume de acetato de etila e um volume de clorofórmio (este lavado exaustivamente com água destilada, para a remoção do etanol que contém) além do tratamento com carvão ativo.

A análise dos hidrolisados extraídos, bem como dos solventes extratores por g.l.c. comparativamente à um padrão de furfural, está representada na tabela VI.

O hidrolisado de cana ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas) controle, sem nenhum tratamento, apresentou uma concentração de furfural de 0,111% v/v, enquanto que a concentração deste hidrolisado, duas vezes até xarope, em rotavapor, reduz o conteúdo de furfural para 0,065% v/v.

Quando o mesmo hidrolisado foi tratado com clorofórmio, houve uma redução de 41,45% no teor de furfural inicial, obtendo-se uma concentração do mesmo semelhante àquela obtida no hidrolisado duas vezes concentrado.

Já o tratamento com acetato de etila foi menos eficiente na extração de furfural. O hidrolisado tratado com este solvente, ainda apresentou 84,68% do furfural originalmente presente na amostra, uma vez que apenas 0,019% v/v de furfural foram detectados no solvente extrator.

O tratamento com carvão ativo diminuiu o teor de furfural do hidrolisado em 45,04%.

TABELA VI - Extração de hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$  a 0,125% v/v; 10 atmosferas) de bagaço de cana com clorofórmio, acetato de etila e carvão ativo.

Tratamento	Concentração de furfural (v/v)	
	Solvente extrator	Hidrolisado
Nenhum	-	0,111
Concentração (2 vezes)	-	0,065
Clorofórmio	0,046	0,065
Acetato de etila	0,019	0,094
Carvão	-	0,061

Experiência realizada como descrito no item 2.4.9. de Materiais e Métodos.

## 9. Efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pela levedura Pachysolen tannophilus.

O efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pela levedura Pachysolen tannophilus, é apresentado na tabela VII.

Variando-se a concentração de  $H_3PO_4$  de 0 a 2,0% v/v, observa-se ao final de 96 horas de fermentação, variações significativas nas taxas de crescimento celular, expressas através da  $DO_{650nm}$  (tabela VII-A).

Para concentrações do ácido de 0,25 e 0,50% v/v, obteve-se um crescimento de 2,10 e 1,96 respectivamente, valores superiores àquele obtido para o controle (sem a adição de  $H_3PO_4$ ).

O emprego de maiores concentrações de  $H_3PO_4$ , variáveis entre 0,75 e 2,0% v/v, ocasiona porém uma diminuição na taxa de crescimento da levedura. Para a maior concentração empregada (2,0% v/v) observa-se uma taxa de crescimento de 1,10 ou seja, apenas 56,7% do crescimento verificado sem a adição de fosfato.

Estas afirmações podem ser confirmadas através do peso seco das células obtidas após 96 horas de fermentação (tabela VII-D).

No que diz respeito à produção de etanol, ela é estimulada quando uma concentração de  $H_3PO_4$  de 0,25% v/v é adicionada ao meio de fermentação (tabela VII-C). Este é um achado importante, pois o emprego de  $H_3PO_4$  a menores concentrações (e.g. 0,1% v/v) e uso de melhor aparelhagem na etapa hidrolítica (pressões e temperaturas na faixa de 10 atmosferas em reator, o que garante hidrólise completa), permitirá a concentração do hidrolisado, aumentando a concentração de substrato, e portanto a obtenção de maior massa celular e etanol.

Com 0,25% v/v de  $H_3PO_4$ , obteve-se ao final de 55 horas de incubação, 0,20g de etanol/g de D-xilose consumida.

A partir de concentrações do ácido de 0,5% v/v, ocorre um efeito inibitório dos íons fosfato sobre a produção do solvente. Após 72 horas de fermentação, com 0,75% de  $H_3PO_4$  v/v,

TABELA VII - Efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pela levedura Pachysolen tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

$H_3PO_4$ % v/v	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
-	0,015	0,69	0,91	1,28	1,38	1,75	1,79	1,94
0,25	0,015	0,70	0,91	1,35	1,50	1,85	1,99	2,10
0,50	0,015	0,64	0,82	1,19	1,28	1,57	1,72	1,96
0,75	0,015	0,57	0,73	1,08	1,17	1,42	1,61	1,75
1,00	0,015	0,54	0,69	1,00	1,04	1,35	1,50	1,71
1,25	0,015	0,47	0,61	0,92	0,99	1,15	1,31	1,50
1,50	0,018	0,43	0,57	0,85	0,92	1,10	1,19	1,40
2,00	0,022	0,40	0,52	0,80	0,82	1,00	1,01	1,10

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

$H_3PO_4$ % v/v	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
-	1,71	1,23	0,96	0,34	0,20	0,019	0,013	0,011
0,25	1,73	1,23	0,91	0,34	0,16	0,070	0,060	0,004
0,50	1,71	1,31	1,01	0,42	0,30	0,044	0,070	0,060
0,75	1,73	1,31	1,04	0,49	0,30	0,086	0,008	0,004
1,00	1,71	1,35	0,93	0,50	0,36	0,089	0,010	0,006
1,25	1,77	1,35	1,10	0,55	0,45	0,100	0,027	0,007
1,50	1,83	1,35	1,09	0,58	0,45	0,130	0,028	0,007
2,00	1,73	1,41	1,15	0,66	0,56	0,210	0,110	0,110

## C) ETANOL (g%)

$H_3PO_4$ % v/v	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
-	0	0,084	0,184	0,262	0,307	0,257	0,188	0,056
0,25	0	0,091	0,184	0,264	0,320	0,266	0,180	0,035
0,50	0	0,069	0,132	0,191	0,249	0,255	0,187	0,062
0,75	0	0,070	0,125	0,178	0,234	0,247	0,200	0,098
1,00	0	0,058	0,112	0,164	0,204	0,221	0,181	0,100
1,25	0	0,056	0,101	0,160	0,169	0,229	0,221	0,110
1,50	0	0,044	0,085	0,128	0,148	0,188	0,166	0,123
2,00	0	0,030	0,064	0,104	0,141	0,148	0,144	0,126

## D) PESO SECO DOS MICÉLIOS E DOS POLISSACARÍDEOS PRECIPITADOS DOS MEIOS FERMENTADOS DURANTE 96 HORAS (g%).

$H_3PO_4$ % (v/v)	Micélios	Polissacarídeos
-	0,4538	0,2158
0,25	0,4672	0,2420
0,50	0,4646	0,2772
0,75	0,4237	0,2940
1,00	0,4304	0,3078
1,25	0,3742	0,3188
1,50	0,3582	0,3242
2,00	0,2992	0,3470

Cada um dos cultivos de 100ml preparados como descrito no ítem 2.5.5.1.1. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 48 horas, com  $DO_{650nm} = 2,275$ .

há a formação de 0,150g etanol/g D-xilose consumida, taxa esta que diminui para 0,097g/g D-xilose consumida, quando se eleva a concentração do ácido para 2% v/v.

Com relação ao consumo do etanol formado, pela própria levedura, verifica-se que quanto maior a concentração de fosfato, tanto menos intensa é a metabolização. Para a maior concentração de fosfato empregada, ao final de 96 horas, houve a metabolização de apenas 14,86% do álcool formado, enquanto que no controle, neste mesmo período de tempo, houve o consumo de 81,75% do etanol inicialmente formado.

A secreção de polissacarídeos extracelulares em função de variáveis concentrações de fosfatos, foi avaliada nos cultivos de 96 horas. Na tabela VII-D pode-se verificar que quanto maior a concentração de íons fosfato no meio, tanto maior é a concentração de polissacarídeos exocelulares precipitados do meio de cultivo, isento de células. Para o controle, a quantidade de polissacarídeos secretada é de 0,2158g%, enquanto que concentrações de  $H_3PO_4$  de 2% v/v, aumentam esta secreção para 0,3470g%.

#### 10. Efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pelo fungo Fusarium oxysporum.

A avaliação da influência dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pelo fungo Fusarium oxysporum, pode ser feita através da análise da tabela VIII.

Com concentrações de  $H_3PO_4$  de 0,25 ; 0,50 e 0,75% v/v, observou-se ao final de 89 horas de incubação, um estímulo no crescimento micelial (tabela VIII-A).

Aumentando-se esta concentração para 1,0 e 1,25% v/v, há uma diminuição da taxa de crescimento do fungo. Para concentrações de  $H_3PO_4$  de 0,25 ; 0,75 e 1,25% v/v, obtiveram-se valores de  $DO_{650nm}$  iguais a 1,23 ; 1,26 e 1,17 respectivamente, todos superiores ao valor 1,14 obtido para o cultivo controle.

A produção de álcool teve um perfil muito semelhante ao crescimento micelial. Na tabela VIII-C pode-se constatar que

TABELA VIII - Efeito dos íons fosfato no crescimento e produção de etanol pelo fungo Fusarium oxysporum.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> % v/v	Tempo de fermentação (horas)			
	0	18	41	89
-	0,08	0,66	1,08	1,14
0,25	0,10	0,64	1,20	1,23
0,50	0,09	0,63	1,20	1,24
0,75	0,09	0,54	1,23	1,26
1,00	0,09	0,45	1,17	1,23
1,25	0,11	0,54	1,14	1,17

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> % v/v	Tempo de fermentação (horas)			
	0	18	41	89
-	0,72	0,37	0,13	0,065
0,25	0,78	0,36	0,12	0,043
0,50	0,76	0,45	0,12	0,029
0,75	0,76	0,49	0,14	0,029
1,00	0,77	0,51	0,13	0,029
1,25	0,77	0,50	0,14	0,031



## C) ETANOL (g%)

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> % v/v	Tempo de fermentação (horas)			
	0	18	41	89
-	0	0,15	0,27	0,019
0,25	0	0,15	0,30	0,023
0,50	0	0,20	0,30	0,035
0,75	0	0,13	0,31	0,035
1,00	0	0,13	0,29	0,035
1,25	0	0,12	0,29	0,041

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.1.2. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 4ml de cultura de 79 horas, com  $DO_{650nm} = 1,30$ .

todas as concentrações de  $H_3PO_4$  ensaiadas, estimulam a produção de etanol. Esta chega a ser máxima com 0,75% v/v de  $H_3PO_4$ , quando se obtém uma concentração de etanol de 0,31g%.

#### 11. Determinação do pH ótimo para a levedura Pachysolen tannophilus.

A determinação do pH ótimo de crescimento e/ou produção de etanol pela levedura Pachysolen tannophilus, foi realizada num meio à base de D-xilose, com valores de pH variáveis entre 1,0 e 5,0 e seus resultados constam da tabela IX.

Na tabela IX-A constata-se que o crescimento celular é diretamente influenciado pelo pH inicial do meio de cultura.

Não ocorreu crescimento da levedura em cultivos cujos pH iniciais eram de 1,0 e 1,5; quando o pH inicial foi de 2,0 ocorreu uma ligeira multiplicação celular e com valores crescentes de pH, variáveis entre 2,0 e 5,0, houve um aumento gradativo nos valores de  $DO_{650nm}$ , obtidos após 96 horas de incubação.

O pH ótimo para o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus é 5,0 com o qual se obteve uma  $DO_{650nm} = 2,32$ .

A análise dos dados das tabelas IX-B e IX-C, nos mostram que nos cultivos onde não ocorreu crescimento, não houve consumo de CR, nem tampouco produção de etanol. Quando o pH inicial dos cultivos foi aumentado de 2,0 para 4,0, houve um aumento gradual na concentração do solvente formado. Concentração máxima de etanol (0,193g%) foi obtida no cultivo com pH inicial 4,0 após 72 horas de incubação, sendo que valores menos acídicos de pH, iguais a 4,5 e 5,0, provocam um decréscimo na produção de álcool.

Após este tempo ótimo de incubação, houve a metabolização do próprio solvente formado, em todos os cultivos.

TABELA IX - Determinação do pH ótimo para a levedura Pachyso-  
len tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

pH	Tempo de fermentação (horas)				
	0	24	48	72	96
1,0	0,034	0,024	0,032	0,040	0,052
1,5	0,034	0,040	0,052	0,040	0,052
2,0	0,034	0,132	0,180	0,210	0,260
2,5	0,032	0,290	0,690	0,780	1,020
3,0	0,033	0,650	1,080	1,440	1,960
3,5	0,034	0,700	1,100	1,580	2,100
4,0	0,035	0,760	1,150	1,160	1,760
4,5	0,033	0,800	1,380	1,560	2,160
5,0	0,034	0,840	1,400	1,960	2,320

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

pH	Tempo de fermentação (horas)				
	0	24	48	72	96
1,0	2,48	2,41	2,23	2,27	2,21
1,5	2,48	2,48	2,40	2,44	2,43
2,0	2,48	2,47	1,94	1,76	1,32
2,5	2,48	2,23	1,17	0,75	0
3,0	2,48	1,94	0,88	0,33	0
3,5	2,48	1,76	0,85	0,28	0
4,0	2,48	1,88	0,94	0,31	0
4,5	2,48	1,77	0,82	0,25	0
5,0	2,48	1,81	0,82	0,20	0

## C) ETANOL (g%)

pH	Tempo de fermentação (horas)				
	0	24	48	72	96
1,0	0	0	0	0	0
1,5	0	0	0	0	0
2,0	0	0,008	0,031	0,066	0,047
2,5	0	0,032	0,098	0,118	0,092
3,0	0	0,057	0,104	0,116	0,072
3,5	0	0,068	0,143	0,158	0,051
4,0	0	0,045	0,103	0,193	0,115
4,5	0	0,041	0,146	0,148	0,063
5,0	0	0,040	0,140	0,124	0,013

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.1.3. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 72 horas, com  $DO_{650nm} = 1,96$ .

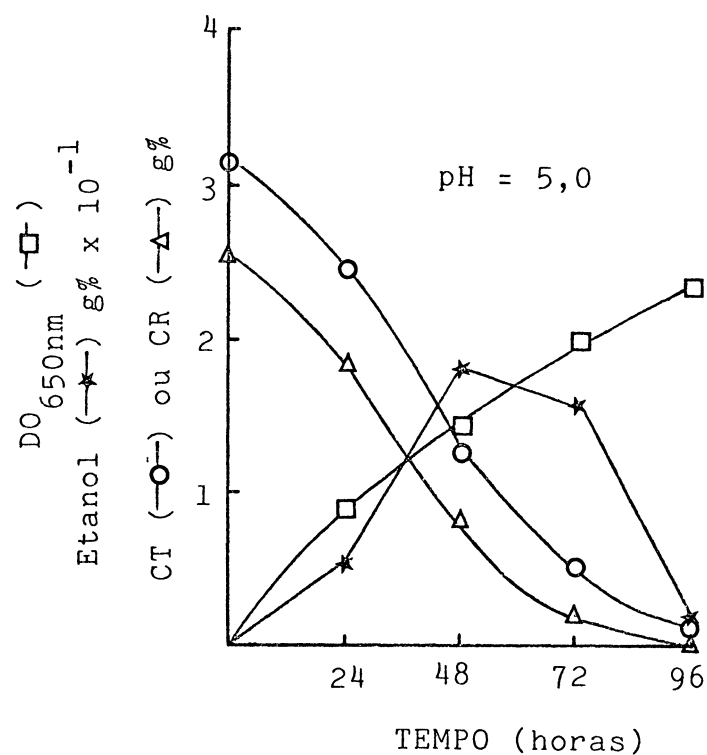
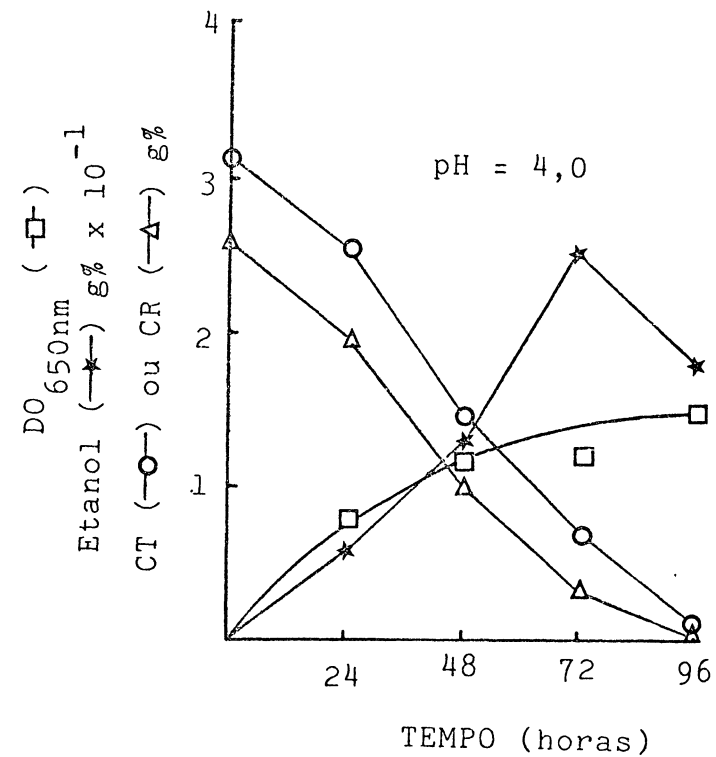


FIGURA 19: Comportamento da levedura *Pachysolen tannophilus* em solução de D-xilose a 3g% em pH 4,0 (ótimo para produção de etanol) e em pH 5,0 (ótimo para o crescimento celular).

Experiência realizada como descrito no item 2.5.5.1.3. de Materiais e Métodos.

## 12. Determinação do pH ótimo para o fungo Fusarium oxysporum

A determinação do pH ótimo de crescimento do fungo a cima referido, foi realizada num meio à base de D-xilose com valores de pH variáveis entre 1,0 e 5,0 e seus resultados constam da tabela X.

A análise de seus dados, nos mostra que após 96 horas de incubação, não ocorre crescimento do fungo, quando o pH inicial do meio de cultura está entre 1,0 e 1,5; quando este pH inicial é de 2,0 ocorre um ligeiro crescimento micelial, cujos valores tornam-se significativamente maiores à medida que se aumenta o pH para 2,5 , 3,0 e 3,5 , a partir do qual ocorre um leve decréscimo nas taxas de crescimento.

Nestas condições, após 96 horas de incubação, no cultivo que apresentou a melhor taxa de crescimento (pH = 3,5) , mesmo com consumo de 84% do carbohidrato redutor inicialmente presente, não houve a formação de quantidades significativas de etanol.

## 13. Determinação do pH ótimo para a levedura Candida shehatae

Quando a levedura Candida shehatae 1 foi cultivada num meio contendo como fonte de carbono, a D-xilose e valores de pH variáveis entre 1,5 e 5,5 obtiveram-se os dados da tabela XI.

A análise da tabela XI-A, nos mostra que na condição mais acídica (pH - 1,5) não há crescimento celular, o qual é aumentado significativamente quando se passa para pH 3,5.

O emprego de valores mais elevados de pH, entre 4,5 e 5,5 , não tem praticamente efeito adicional sobre o crescimento celular.

A produção máxima de etanol (tabela XI-C), após 30 horas de incubação, ocorreu no meio cujo pH inicial era de 4,5; com rendimentos de 0,43g/g D-xilose consumida. Após este período de incubação, a levedura utiliza o álcool formado como fonte de energia e carbono, uma vez que nesta fase a concentração

TABELA X - Determinação do pH ótimo para o fungo Fusarium oxysporum.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

pH	Tempo de fermentação (horas)				
	0	24	48	72	96
1,0	0,016	0,018	0,016	0,016	0,020
1,5	0,016	0,018	0,018	0,016	0,024
2,0	0,016	0,068	0,088	0,120	0,180
2,5	0,016	0,272	0,900	1,320	1,580
3,0	0,016	0,708	2,000	2,280	2,520
3,5	0,016	0,732	2,040	2,480	2,560
4,0	0,016	0,856	1,860	2,240	2,520
4,5	0,016	0,840	1,700	2,120	2,340
5,0	0,016	0,840	1,680	2,080	2,300

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

pH	Tempo de fermentação (horas)				
	0	24	48	72	96
1,0	2,53	2,52	2,33	2,38	2,42
1,5	2,53	2,47	2,47	2,47	2,48
2,0	2,53	2,47	2,45	2,40	2,33
2,5	2,53	2,30	1,91	1,38	1,04
3,0	2,53	2,09	1,33	0,80	0,44
3,5	2,53	2,12	1,25	0,72	0,40
4,0	2,53	2,03	1,54	0,90	0,56
4,5	2,53	1,91	1,66	1,12	0,75
5,0	2,53	2,16	1,50	1,08	0,72

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no ítem 2.5.5.1.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml

TABELA XI - Determinação do pH ótimo para a levedura Candida shehatae.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

pH	Tempo de fermentação (horas)			
	0	21	30	45
1,5	0,022	0,060	0,020	0,020
2,5	0,031	0,390	0,840	1,220
3,5	0,029	0,645	0,950	1,320
4,5	0,024	0,630	0,900	1,300
5,5	0,030	0,620	0,910	1,300

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

pH	Tempo de fermentação (horas)			
	0	21	30	45
1,5	1,71	1,71	1,62	1,71
2,5	1,71	1,35	0,28	0,10
3,5	1,71	0,61	0,032	0,005
4,5	1,71	0,45	0,014	0,009
5,5	1,71	0,48	0,021	0,019



## C) ETANOL (g%)

pH	Tempo de fermentação (horas)			
	0	21	30	45
1,5	0	0	0	0
2,5	0	0,232	0,589	0,587
3,5	0	0,567	0,732	0,582
4,5	0	0,589	0,739	0,542
5,5	0	0,553	0,721	0,471

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.1.4. de Materiais e Métodos, foi inoculado com cultura de 69 horas, com  $DO_{650nm} = 1,27$ .

de açúcar é praticamente nula (cultivos com pH 3,5 , 4,5 e 5,5) mas ainda ocorrendo um significativo aumento da concentração celular.

Com relação à produção de etanol, em valores absolutos, ela é máxima em pH 4,5 , porém em cultivos com até uma unidade a menos de pH (3,5) obtém-se rendimentos muito próximos, na faixa de 0,43g/g D-xilose consumida.

#### 14. Efeito dos íons cloreto e/ou sulfato no crescimento da levedura Pachysolen tannophilus

Com o propósito de verificar se uma hidrólise fosfórica de materiais lignocelulósicos, associada à uma hidrólise clorídrica e/ou sulfúrica, propiciava a obtenção de uma maior concentração celular da levedura, para fins de obtenção de bio massa microbiana (SCP = Single Cell Protein), foi realizado o crescimento da mesma em meio básico contendo 0,25% v/v de  $H_3PO_4$  ao qual foram adicionadas quantidades variáveis de cloretos e sulfatos.

Os resultados da tabela XII, nos mostram que no meio básico, obteve-se um crescimento de 1,56 unidades de absorbância, após 66 horas de incubação. Quando em presença de 0,01g% de cloreto, há um leve estímulo da taxa de crescimento ( $DO_{650} = 1,64$ ), porém quando esta é aumentada para 0,05g% observa-se um crescimento 2,56% menor do que aquele obtido para o controle.

Os íons sulfato estimulam levemente o crescimento, em todas as concentrações ensaiadas. O emprego de 0,01g%, 0,025g% e 0,05g% de sulfatos, proporciona a obtenção de uma concentração celular, respectivamente, 1,11 , 1,15 e 1,21 vezes superior àquela obtida no meio que contém somente o fosfato.

Quando se associa ao meio básico contendo  $H_3PO_4$ , íons cloreto e sulfato numa concentração individual de 0,025g%, obtém-se uma  $DO_{650nm}$  de 1,82 , valor superior àquele obtido quando do emprego de cada um dos íons separadamente.

TABELA XII - Influência dos íons cloreto e sulfato no crescimento da levedura Pachysolen tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Meio básico	Suplementação		Tempo (horas)			
	Cl <sup>-</sup> (g%)	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> (g%)	18	40	48	66
+	-	-	0,76	1,46	1,54	1,56
+	0,010	-	0,78	1,46	1,48	1,64
+	0,025	-	0,74	1,36	1,44	1,60
+	0,050	-	0,72	1,36	1,42	1,52
+	-	0,010	0,72	1,48	1,58	1,74
+	-	0,025	0,76	1,54	1,68	1,80
+	-	0,050	0,68	1,48	1,70	1,90
+	0,025	0,025	0,72	1,54	1,66	1,82

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Meio básico	Suplementação		Tempo (horas)			
	Cl <sup>-</sup> (g%)	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> (g%)	18	40	48	66
+	-	-	2,56	1,10	0,71	0,18
+	0,010	-	2,48	0,92	0,66	0,15
+	0,025	-	2,27	1,03	0,69	0,17
+	0,050	-	2,45	1,04	0,61	0,23
+	-	0,010	2,48	1,17	0,76	0,20
+	-	0,025	2,63	0,99	0,60	0,12
+	-	0,050	2,41	1,08	0,37	0,07
+	0,025	0,025	2,34	1,08	0,53	0,10

O meio básico era constituído por: 3g% de D-xilose, 0,1g% de extrato de levedura, 0,5ml% de solução de Vogel e 0,25ml% de  $H_3PO_4$  a 85%. Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no ítem 2.5.5.1.6. de Materiais e Métodos , foi inoculado com 2ml de cultura de 96 horas, com  $DO_{650nm} = 1,80$  ( $DO_{650nm}$  hora zero = 0,062).

15. Efeito dos íons cloreto e/ou sulfato no crescimento do fungo Fusarium oxysporum.

Os resultados da tabela XIII nos mostram o comportamento do fungo, quando crescido em meio básico contendo 0,25% v/v de  $H_3PO_4$  e acrescido de concentrações variáveis de cloreto e/ou sulfato.

Após 72 horas de incubação, obteve-se para o controle, contendo apenas  $H_3PO_4$ , um crescimento micelial de 2,32 unidades de absorbância, avaliado através da  $DO_{650nm}$ .

Há um leve estímulo no crescimento do fungo na presença de 0,01g% de cloreto, porém quando esta concentração é aumentada para 0,025 e 0,05g%, há novamente uma inibição da multiplicação, aparente pelos valores de  $DO$  de 2,14 e 2,12, inferiores àqueles obtidos para o cultivo controle.

Tal como ocorreu com a levedura Pachysolen tannophilus, os íons sulfato estimulam levemente o crescimento do fungo em todas as concentrações ensaiadas.

O crescimento do fungo em meio contendo 0,01g%, 0,025g% e 0,05g% de sulfato, foi respectivamente, 1,05, 1,07 e 1,08 vezes superior àquele obtido para o controle.

Quando da associação dos íons cloreto e sulfato numa concentração individual de 0,025g%, obteve-se uma  $DO$  de 2,48, superior àquela obtida para o cultivo controle, porém inferior ligeiramente, àquela obtida quando cada um destes íons foi acrescido isoladamente ao meio básico contendo fosfato.

16. Efeito da suplementação de hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana com solução de sais minerais e diversas fontes de nitrogênio, na fermentação com a levedura Pachysolen tannophilus e o fungo Fusarium oxysporum.

O comportamento da levedura Pachysolen tannophilus, quando crescida em hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; CR = 1,80g%) está representado na tabela XIV.

O hidrolisado simplesmente neutralizado a pH 4,0, a

TABELA XIII - Influência dos íons cloreto e sulfato no crescimento do fungo Fusarium oxysporum.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Meio básico	Suplementação		Tempo (horas)		
	Cl <sup>-</sup> (g%)	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> (g%)	24	48	72
+	-	-	0,44	1,84	2,32
+	0,010	-	0,48	1,86	2,54
+	0,025	-	0,44	1,84	2,14
+	0,050	-	0,40	1,72	2,12
+	-	0,010	0,42	1,82	2,44
+	-	0,025	0,34	1,60	2,49
+	-	0,050	0,41	1,92	2,52
+	0,025	0,025	0,45	1,76	2,48

B) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Meio básico	Suplementação		Tempo (horas)		
	Cl <sup>-</sup> (g%)	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> (g%)	24	48	72
+	-	-	2,39	1,84	0,92
+	0,010	-	2,19	1,84	0,88
+	0,025	-	2,46	1,84	0,96
+	0,050	-	2,46	2,14	1,02
+	-	0,010	2,43	1,68	0,76
+	-	0,025	2,69	1,76	0,70
+	-	0,050	2,29	1,34	0,55
+	0,025	0,025	2,16	1,42	0,60

\* Composição do meio básico descrito na página 134.

\* O meio básico era constituído por: 3g% de D-xilose , 0,1g% de extrato de levedura, 0,5ml% de solução de Vogel e 0,25ml% de  $H_3PO_4$  a 85%. Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.1.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 0,5ml de cultura de 94 horas, com  $DO_{650nm} = 3,04$  ( $DO_{650nm}$  hora zero = 0,034).

pós 72 horas de incubação propiciou um crescimento da levedura na ordem de 0,42. Este crescimento celular da levedura é diretamente influenciado pela adição de sais minerais e fontes de nitrogênio, ao meio de fermentação, como pode ser visto na tabela XIV-A. A adição de 0,5ml% da solução de Vogel; 0,1g% de extrato de levedura; 0,5ml% da solução de Vogel + 0,1g% de extrato de levedura; 0,5ml% da solução de Vogel + 0,1g% de extrato de levedura + 0,1g% de uréia; 0,5ml% da solução de Vogel + 0,1g% de peptona, aumentou as  $DO_{650nm}$  após 72 horas de incubação, para 2,00 ; 2,25 ; 2,80 ; 2,72 e 2,55 respectivamente, todas expressivamente superiores em relação àquela obtida para o hidrolisado controle, simplesmente neutralizado.

O mesmo hidrolisado, duas vezes concentrado (CR=3,52 g%), quando suplementado com a solução de Vogel a 0,5ml% e mesmo com extrato de levedura a 0,1g%, facultou um crescimento da levedura de 0,40 e 0,37 respectivamente, ambos ligeiramente menores do que aquele obtido com o hidrolisado original.

Um crescimento de 2,45 foi obtido quando este hidrolisado concentrado, foi previamente extraído com clorofórmio.

A produção de etanol (tabela XIV-D) apenas foi significativa neste último caso, quando se obteve um rendimento de 0,45g etanol/g D-xilose consumida em 48 horas de fermentação.

Nas 24 seguintes horas de fermentação, mesmo com uma concentração de açúcares redutores de 2,25g%, houve a metabolização de 28,5% do etanol formado.

A mesma experiência realizada com o fungo Fusarium oxysporum, somente apresentou produção de álcool após 165 horas de fermentação em concentração de 0,46g%, equivalente a 0,30g etanol/g D-xilose consumida.



TABELA XIV - Efeito da suplementação de hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2,25 atmosferas; 2 horas) com solução de sais minerais e diversas fontes de nitrogênio, na fermentação com a levedura Pachysolen tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Hidrolisado	Hidrolisado concentrado (2x)	Suplementações				Tempo de fermentação (horas)			
		Vogel ml%	Extrato levedura g%	Uréia g%	Peptona g%	0	24	48	72
+	-	-	-	-	-	0,14	0,15	0,39	0,42
+	-	0,5	-	-	-	0,14	0,48	1,60	2,00
+	-	-	0,1	-	-	0,14	0,48	2,07	2,25
+	-	0,5	0,1	-	-	0,14	0,55	2,32	2,80
+	-	0,5	0,1	0,1	-	0,15	0,58	2,40	2,72
+	-	0,5	-	-	0,1	0,15	0,47	2,22	2,55
-	+	0,5	-	-	-	0,18	0,26	0,37	0,40
-	+	0,5	0,1	-	-	0,19	0,20	0,32	0,37
-	+	0,5	-	-	-	0,18	0,29	1,60	2,45

\* Este cultivo com o hidrolisado 2 vezes concentrado, foi previamente extraído com clorofórmio.

B) CARBOHIDRATOS TOTAIS (g%)

Hidrolisado	Hidrolisado concentrado (2x)	Suplementações				Tempo de fermentação (horas)			
		Vogel	Extrato levedura	Uréia	Peptona	0	24	48	72
		ml%	g%	g%	g%				
+	-	-	-	-	-	2,10	1,90	1,62	1,59
+	-	0,5	-	-	-	2,10	1,83	1,15	0,78
+	-	-	0,1	-	-	2,10	1,93	1,25	0,68
+	-	0,5	0,1	-	-	2,10	1,83	0,93	0,59
+	-	0,5	0,1	0,1	-	2,10	1,73	1,04	0,65
+	-	0,5	-	-	0,1	2,10	1,80	1,04	0,64
-	+	0,5	-	-	-	3,89	3,53	3,50	3,18
-	+	0,5	0,1	-	-	3,89	3,73	3,56	3,43
-	+	0,5	-	-	-	3,89	3,40	3,12	2,43

\* Este cultivo com o hidrolisado 2 vezes concentrado, foi previamente extraído com clorofórmio.

C) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Hidrolisado	Hidrolisado concentrado (2x)	Suplementações				Tempo de fermentação (horas)			
		Vogel ml%	Extrato levedura g%	Uréia g%	Peptona g%	0	24	48	72
+	-	-	-	-	-	1,80	1,73	1,44	1,22
+	-	0,5	-	-	-	1,80	1,67	0,72	0,17
+	-	-	0,1	-	-	1,80	1,54	0,80	0,14
+	-	0,5	0,1	-	-	1,80	1,50	0,48	0,13
+	-	0,5	0,1	0,1	-	1,80	1,48	0,40	0,14
+	-	0,5	-	-	0,1	1,80	1,60	0,57	0,10
-	+	0,5	-	-	-	3,52	3,27	2,88	2,76
-	+	0,5	0,1	-	-	3,52	3,31	3,20	2,88
-	+*	0,5	-	-	-	3,52	3,39	2,52	1,68

\* Este cultivo com o hidrolisado 2 vezes concentrado, foi previamente extraído com clorofórmio.

## D) ETANOL (g%)

Hidrolisado	Hidrolisado concentrado (2x)	Suplementações				Tempo de fermentação (horas)			
		Vogel	Extrato levedura	Uréia	Peptona				
		ml%	g%	g%	g%	0	24	48	72
+	-	-	-	-	-	0	0,013	0,027	0,003
+	-	0,5	-	-	-	0	0,010	0,023	0,003
+	-	-	0,1	-	-	0	0,013	0,026	0,004
+	-	0,5	0,1	-	-	0	0,010	0,055	0,003
+	-	0,5	0,1	0,1	-	0	0,008	0,046	0,002
+	-	0,5	-	-	0,1	0	0,012	0,029	0,004
-	+	0,5	-	-	-	0	0,010	0,070	0,005
-	+	0,5	0,1	-	-	0	0,015	0,020	0,017
-	+	0,5	-	-	-	0	0,260	0,420	0,300

\* Este cultivo com o hidrolisado 2 vezes concentrado, foi previamente extraído com clorofórmio.

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.1. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 0,5ml de cultura de 48 horas, com  $DO_{650nm} = 3,60$ .

17. Efeito da suplementação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus com sais minerais e extrato de levedura, na fermentação com a levedura Pachysolen tannophilus.

O comportamento da levedura Pachysolen tannophilus em hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus, está representado na tabela XV.

Quando o meio de cultivo era constituído simplesmente pelo hidrolisado neutralizado, obteve-se após 35 horas de fermentação, um crescimento celular igual a 0,48; este foi melhorado para 0,50 pela adição da solução de Vogel a 0,5ml%; para 0,62 pela suplementação do meio com 0,1g% de extrato de levedura; para 0,65 quando do uso simultâneo da solução de Vogel a 0,5ml% e extrato de levedura a 0,1g% e finalmente para 0,73 quando se utilizou a solução de Vogel a 0,5ml% , mas a concentração do extrato de levedura foi aumentada para 0,3g% (tabela XV-A).

Nos cultivos apenas neutralizado e adicionado de 0,5 ml% da solução de Vogel, onde ao final de 35 horas se obtiveram os menores valores para a D<sub>0</sub>, houve uma produção de etanol de 0,18 e 0,20g% respectivamente, o que equivale a um rendimento de 0,33 e 0,32g etanol/g D-xilose consumida. Quando do enriquecimento do meio com 0,1g% de extrato de levedura, obteve-se ao final de 25 horas, uma produção de solvente equivalente a 0,42 g etanol/g D-xilose consumida e quando do uso associado da solução de Vogel a 0,5ml% e extrato de levedura a 0,3g%, este rendimento passou para 0,45g etanol/g D-xilose consumida (tabela XV-D).

18. Influência da idade do inóculo na fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus, pela levedura Pachysolen tannophilus.

Com a finalidade de verificar até que ponto a idade do inóculo usado, influencia na velocidade de formação, bem como de metabolização do etanol durante o processo fermentativo,

TABELA XV - Efeito da suplementação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas) com sais minerais e extrato de levedura, na fermentação com a levedura Pachysolen tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Suplementações		Tempo de fermentação (horas)					
Vogel ml%	Extrato levedura g%						
		0	16	19	22	25	35
-	-	0,15	0,18	0,26	0,31	0,39	0,48
0,5	-	0,14	0,23	0,30	0,37	0,42	0,50
-	0,1	0,14	0,34	0,40	0,48	0,55	0,62
0,5	0,1	0,13	0,33	0,41	0,49	0,58	0,65
0,5	0,3	0,14	0,47	0,50	0,57	0,61	0,73

B) CARBOHIDRATOS TOTAIS (g%)

Suplementações		Tempo de fermentação (horas)					
Vogel ml%	Extrato levedura g%						
		0	16	19	22	25	35
-	-	1,28	1,26	1,18	0,95	0,91	0,68
0,5	-	1,34	1,31	1,14	0,91	0,86	0,60
-	0,1	1,33	1,27	1,08	0,87	0,78	0,55
0,5	0,1	1,37	1,29	1,06	0,82	0,77	0,56
0,5	0,3	1,33	1,27	1,02	0,78	0,68	0,42

## C) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Suplementações		Tempo de fermentação (horas)					
Vogel ml%	Extrato levedura g%						
		0	16	19	22	25	35
-	-	0,96	0,97	0,89	0,79	0,74	0,42
0,5	-	0,94	0,93	0,84	0,68	0,63	0,32
-	0,1	0,94	0,74	0,66	0,58	0,51	0,19
0,5	0,1	0,96	0,75	0,66	0,55	0,46	0,18
0,5	0,3	0,93	0,79	0,55	0,45	0,34	0,16

## D) ETANOL (g%)

Suplementações		Tempo de fermentação (horas)					
Vogel ml%	Extrato levedura g%						
		0	16	19	22	25	35
-	-	0	0,009	0,025	0,075	0,110	0,180
0,5	-	0	0,032	0,050	0,110	0,140	0,200
-	0,1	0	0,070	0,120	0,160	0,182	0,170
0,5	0,1	0	0,080	0,150	0,180	0,220	0,120
0,5	0,3	0	0,070	0,190	0,220	0,170	0,070

Cada um dos cultivos de 25 ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.2. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1,12ml de cultura de 30 horas, com  $DO_{650nm} = 1,12$  ( $DO_{650nm}$  inicial teórica = 0,05).

células de Pachysolen tannophilus de 24, 48, 72 e 96 horas foram inoculadas em hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus de modo a obter  $DO_{650nm}$  inicial equivalente.

O crescimento celular obtido após 96 horas de incubação é diretamente proporcional à idade do inóculo utilizado, como pode ser observado na tabela XVI-A. Com o inóculo de 48, 72 e 96 horas, obtiveram-se multiplicações, respectivamente, 10, 13 e 23% superiores às aquelas observadas quando o inóculo usado era de apenas 24 horas.

As curvas referentes à produção de etanol (tabela XVI-D e figura 20-D), tem um perfil bem característico. Quanto mais jovem é o inóculo, tanto mais tardiamente ocorre a produção de etanol, o qual por sua vez é metabolizado mais lentamente pela levedura. A utilização do inóculo de 24 horas, forneceu após 72 horas de fermentação um teor de 0,207g% de álcool, dos quais apenas 18,3% foram consumidos nas 24 horas subsequentes de fermentação.

Já com o inóculo de 96 horas, a máxima produção de etanol ocorreu às 55 horas de fermentação, com uma concentração de 0,254g%. Desta, 61,8% já foi metabolizada nas 17 horas seguintes, e após 80 horas de fermentação não mais foi detectado o solvente no meio fermentado.

A análise dos acetatos de alditóis obtidos após redução e acetilação, quando comparados com os açúcares apenas acetilados, demonstrou que não há presença significativa de xilitol no meio de fermentação.

#### 19. Influência da pressão empregada durante a hidrólise fosfórica de serragem de Pinus, na capacidade fermentativa da levedura Pachysolen tannophilus

Com o propósito de verificar se a pressão empregada durante a hidrólise fosfórica tem influência sobre o rendimento do processo fermentativo posterior, utilizou-se como meio de fermentação hidrolisado de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  a 0,5% v/v), obtido a 2 atmosferas (CR = 1,61g%) e a 6 atmosferas



TABELA XVI - Influência da idade do inóculo na fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas e 30 minutos), pela levedura Pachysolen tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Idade do inóculo	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
24 horas	0,130	0,135	0,125	0,170	0,296	0,580	0,740	1,000
48 horas	0,110	0,130	0,160	0,440	0,540	0,790	0,920	1,100
72 horas	0,150	0,170	0,330	0,610	0,690	0,920	1,090	1,130
96 horas	0,110	0,270	0,420	0,680	0,760	1,030	1,170	1,230

B) CARBOHIDRATOS TOTAIS (g%)

Idade do inóculo	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
24 horas	1,36	1,35	1,35	1,35	1,14	0,87	0,71	0,43
48 horas	1,35	1,38	1,35	1,03	0,91	0,65	0,54	0,42
72 horas	1,35	1,35	1,16	0,85	0,66	0,55	0,52	0,42
96 horas	1,30	1,18	0,99	0,74	0,57	0,51	0,50	0,41

C) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Idade do inóculo	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
24 horas	1,28	1,27	1,29	1,21	1,09	0,67	0,44	0,20
48 horas	1,25	1,28	1,26	0,85	0,72	0,35	0,22	0,19
72 horas	1,27	1,25	0,94	0,57	0,43	0,22	0,21	0,19
96 horas	1,25	1,06	0,81	0,42	0,30	0,19	0,20	0,18

D) ETANOL (g%)

Idade do inóculo	Tempo de fermentação (horas)							
	0	24	32	48	55	72	80	96
24 horas	0	0	0	0	0,065	0,207	0,178	0,169
48 horas	0	0	0	0,135	0,181	0,217	0,110	0
72 horas	0	0	0,139	0,197	0,228	0,130	0	0
96 horas	0	0,072	0,195	0,205	0,254	0,097	0	0

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.3. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 24 horas (DO = 0,55); 0,48ml de 48 horas (DO = 2,29); 0,36ml de 72 horas (DO = 3,05) ou 0,30ml de 96 horas (DO = 3,5).

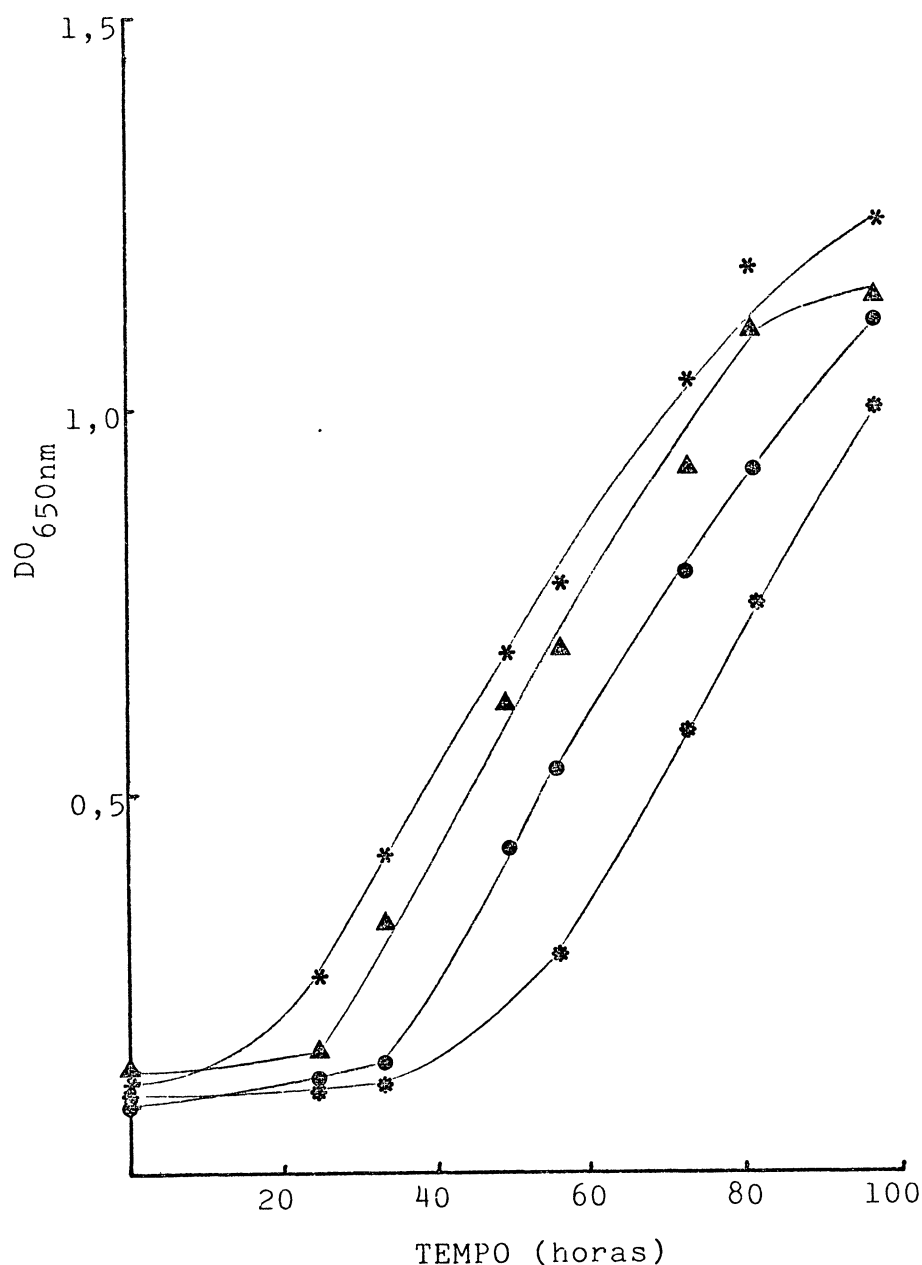


FIGURA 20-A: Influência da idade do inóculo no crescimento da levedura Pachysolen tannophilus, durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas e trinta minutos).

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.3. de Materiais e Métodos, foi inoculado com cultura de 24 horas (\*), 48 horas (●), 72 horas (▲) e 96 horas(\*) em volumes de 2; 0,48; 0,36 e 0,30ml respectivamente, de modo a obter em todos os cultivos  $DO_{650nm}$  inicial equivalente.

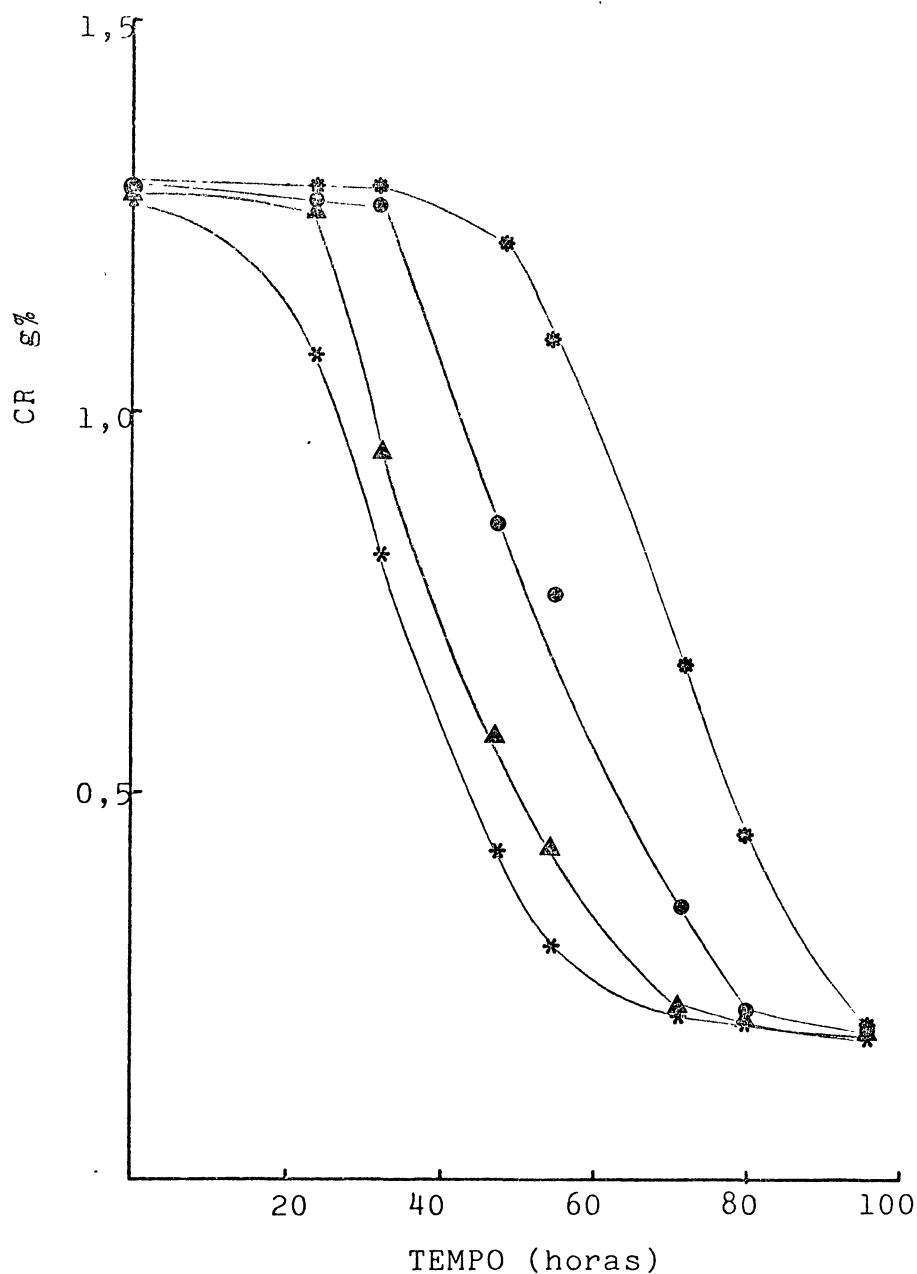


FIGURA 20-B: Influência da idade do inóculo no consumo de CR pela levedura Pachysolen tannophilus, durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas e 30 minutos).

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.3. de Materiais e Métodos, foi inoculado com cultura de 24 horas (\*), 48 horas (●), 72 horas (▲) e 96 horas(\*) em volumes de 2; 0,48; 0,36; e 0,3ml respectivamente, de modo a obter em todos os cultivos  $DO_{650nm}$  inicial equivalente.

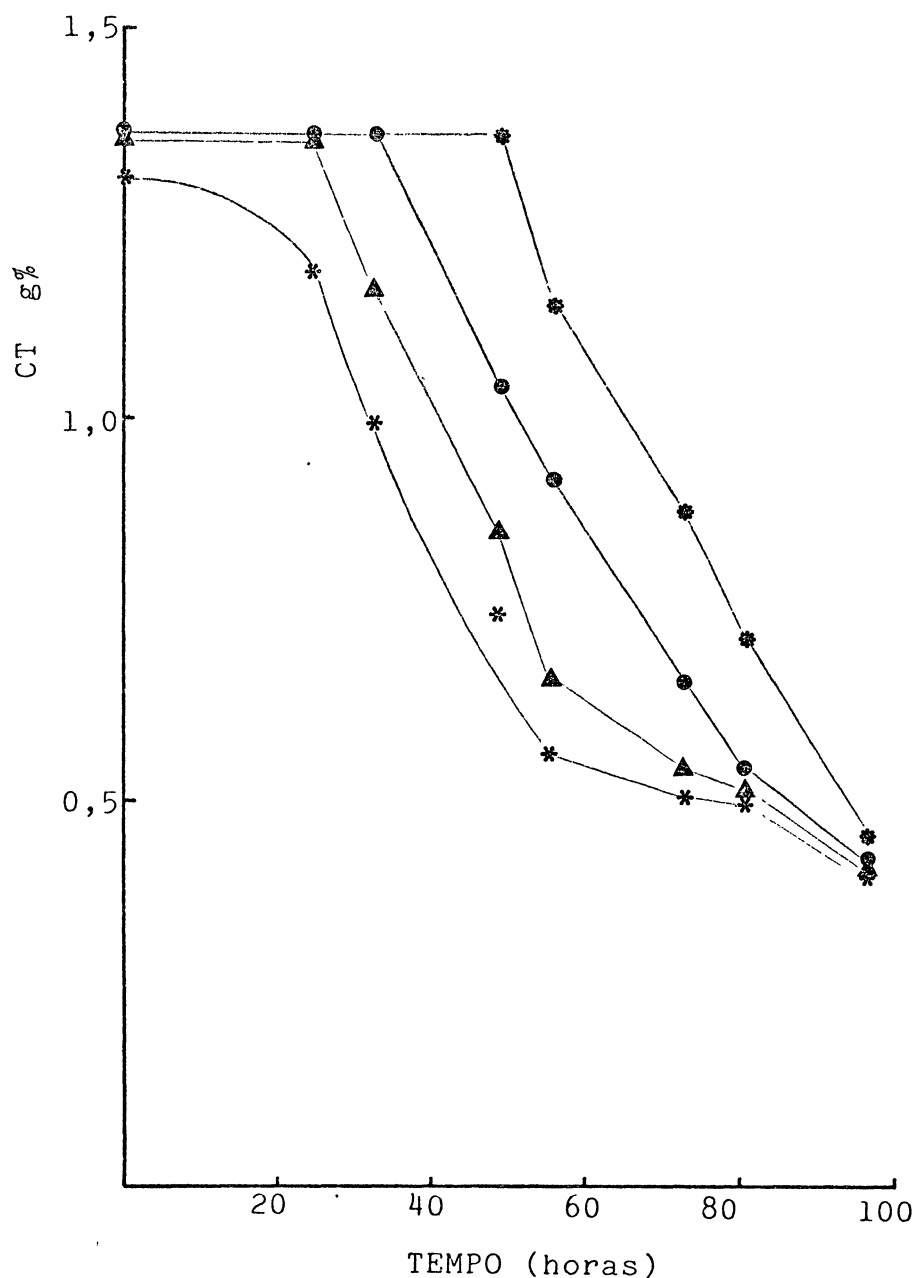


FIGURA 20-C: Influência da idade do inóculo no consumo de CT pela levedura Pachysolen tannophilus, durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serra-gem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas e 30 minutos).

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.3. de Materiais e Métodos, foi inoculado com cultura de 24 horas (\*), 48 horas (●), 72 horas (▲) e 96 horas (x) em volumes de 2; 0,48; 0,36 e 0,3ml respectivamente, de modo a obter em todos os cultivos  $DO_{650nm}$  inicial equivalente.

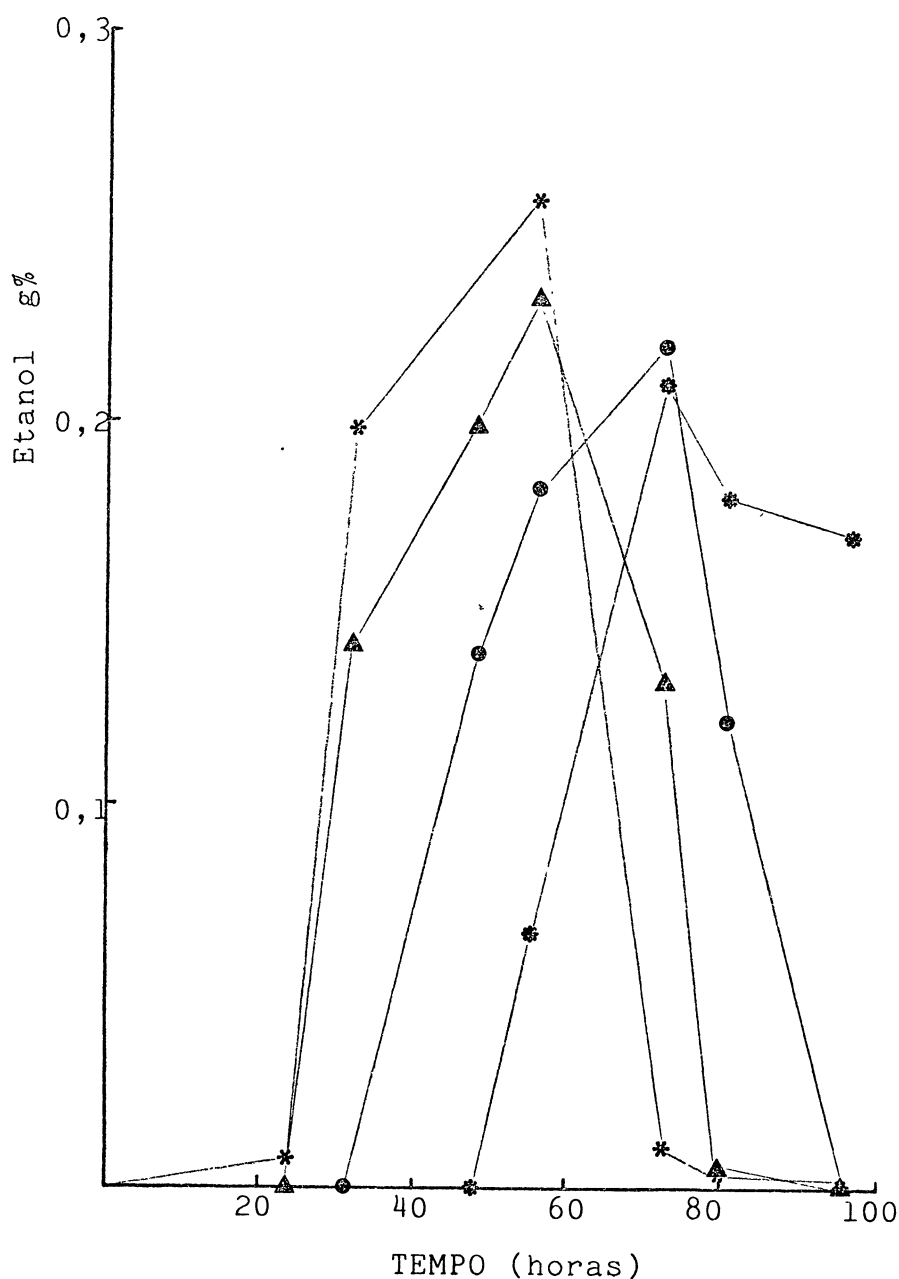


FIGURA 20-D: Influência da idade do inóculo na produção de etanol pela levedura Pachysolen tannophilus, durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas; 2 horas e 30 minutos).

Cada um dos cultivos de 50ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.3. de Materiais e Métodos, foi inoculado com cultura de 24 horas (\*), 48 horas (⊙), 72 horas (▲) e 96 horas (⊛) em volumes de 2; 0,48; 0,36 e 0,3ml respectivamente de modo a obter em todos os cultivos  $DO_{650nm}$  inicial equivalente.

(CR = 1,72g%), suplementados com peptona e extrato de levedura em concentrações de 10%, 30% e 50% da fonte de carbono utilizada.

A tabela XVII nos mostra que o hidrolisado fosfórico obtido com pressão de 2 atmosferas, apresentou um crescimento da levedura de 1,58 , 1,59 e 1,60 unidades de absorbância, respectivamente, quando suplementado com 0,15 , 0,45 e 0,75g% de extrato de levedura. Quando esta fonte de nitrogênio foi substituída pela peptona, nas mesmas concentrações, os valores obtidos para a multiplicação da levedura foram de 1,34 , 1,44 e 1,48 respectivamente (tabela XVII-A).

As  $DO_{650nm}$  obtidas, quando se suplementou o hidrolisado obtido a 6 atmosferas, com 0,15g% de extrato de levedura ou de peptona, foram ligeiramente inferiores àqueles obtidos quando a pressão de hidrólise foi de 2 atmosferas.

Com os hidrolisados obtidos a 2 atmosferas, suplementados com 0,15 , 0,45 e 0,75g% de peptona, a máxima produção de etanol ocorreu com 48 horas de fermentação, com valores de 0,193, 0,244 e 0,272g% correspondentes a 0,154 , 0,182 e 0,197g etanol /g D-xilose consumida (tabela XVII-D).

A adição de extrato de levedura melhora os rendimentos etanólicos, bem como antecipa em 15 horas a máxima produção de solvente para a maior concentração da fonte de nitrogênio usada. Obtém-se 0,205 , 0,208 e 0,244g etanol/g D-xilose consumida, para os meios enriquecidos com extrato de levedura nas concentrações de 0,15 , 0,45 e 0,75g%.

Estes rendimentos são ainda aumentados quando se utiliza o hidrolisado obtido a 6 atmosferas. A adição de 0,15g% de peptona, aumenta a produção de etanol em 1,4 vezes, comparativamente àquela obtida nas mesmas condições, com o hidrolisado obtido a 2 atmosferas.

Quando o hidrolisado obtido a 6 atmosferas, é suplementado com 0,15g% de extrato de levedura, obtém-se um rendimento de 0,315g etanol/g D-xilose consumida, valor 1,53 vezes superior àquele obtido com o hidrolisado a 2 atmosferas.

A análise dos dados da tabela XVII-D, nos mostra ain

TABELA XVII - Influência da pressão empregada durante a hidrólise fosfórica de serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 2 atmosferas durante 2 horas e 30 minutos ou 6 atmosferas durante 1 minuto) na capacidade fermentativa da levedura Pachysolen tannophilus.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Pressão atm	Extrato levedura g%	Peptona g%	Tempo de fermentação (horas)					
			0	24	33	48	58	72
2	0,15	-	0,11	0,38	1,23	1,44	1,52	1,58
2	0,45	-	0,11	0,51	1,31	1,39	1,53	1,59
2	0,75	-	0,10	0,49	1,41	1,41	1,56	1,60
2	-	0,15	0,11	0,37	1,09	1,28	1,32	1,34
2	-	0,45	0,10	0,42	1,20	1,34	1,38	1,44
2	-	0,75	0,11	0,46	1,29	1,35	1,42	1,48
6	0,15	-	0,10	0,42	1,29	1,36	1,41	1,47
6	-	0,15	0,12	0,30	1,08	1,24	1,28	1,33

B) CARBOHIDRATOS TOTAIS (g%)

Pressão atm	Extrato levedura g%	Peptona g%	Tempo de fermentação (horas)					
			0	24	33	48	58	72
2	0,15	-	1,69	1,43	0,85	0,67	0,52	0,34
2	0,45	-	1,69	1,27	0,76	0,62	0,49	0,33
2	0,75	-	1,69	1,31	0,78	0,60	0,46	0,30
2	-	0,15	1,69	1,33	0,83	0,78	0,71	0,66
2	-	0,45	1,69	1,37	0,82	0,69	0,60	0,52
2	-	0,75	1,69	1,35	0,81	0,67	0,56	0,50
6	0,15	-	1,79	1,43	0,86	0,63	0,56	0,50
6	-	0,15	1,79	1,57	1,00	0,86	0,62	0,50



## C) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Pressão atm	Extrato levedura g%	Peptona g%	Tempo de fermentação (horas)					
			0	24	33	48	58	72
2	0,15	-	1,61	1,10	0,55	0,26	0,17	0,14
2	0,45	-	1,61	0,88	0,44	0,26	0,17	0,13
2	0,75	-	1,61	0,86	0,43	0,24	0,18	0,12
2	-	0,15	1,61	1,04	0,52	0,36	0,32	0,25
2	-	0,45	1,61	0,91	0,45	0,27	0,22	0,16
2	-	0,75	1,61	0,95	0,47	0,23	0,16	0,10
6	0,15	-	1,72	1,32	0,66	0,35	0,24	0,16
6	-	0,15	1,72	1,60	0,80	0,66	0,48	0,32

## D) ETANOL (g%)

Pressão atm	Extrato levedura g%	Peptona g%	Tempo de fermentação (horas)					
			0	24	33	48	58	72
2	0,15	-	0	0,119	0,220	0,277	0,146	0,038
2	0,45	-	0	0,155	0,243	0,282	0,152	0,040
2	0,75	-	0	0,174	0,288	0,272	0,157	0,043
2	-	0,15	0	0,092	0,133	0,193	0,138	0,032
2	-	0,45	0	0,095	0,130	0,244	0,155	0,032
2	-	0,75	0	0,125	0,234	0,272	0,146	0,032
6	0,15	-	0	0,176	0,337	0,432	0,293	0,193
6	-	0,15	0	0,106	0,198	0,272	0,253	0,231

Cada um dos cultivos de 50 ml preparados como descrito no item 2.5.5.2.4. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 0,5ml de cultura de 48 horas, com  $DO_{650nm} = 2,3$ .

da que, aumentando-se a pressão de hidrólise da biomassa residual inicial, diminui a velocidade de consumo do etanol formado no processo fermentativo posterior. Quando a pressão empregada foi de 2 atmosferas e as fontes de nitrogênio incorporadas a este hidrolisado numa concentração de 0,15g%, houve ao final de 72 horas um consumo de 86,28% do etanol formado para o extrato de levedura e 83,41% para a peptona. Ao passo que, esta re-metabolização baixou para 55,0% e 15,07% respectivamente, quando o hidrolisado usado foi obtido a 6 atmosferas.

A composição qualitativa dos açúcares dos hidrolisados, obtidos a 2 e 6 atmosferas de pressão, consta da tabela XVIII.

#### 19.1. Perfil de consumo de açúcares

Nas amostras que forneceram os melhores rendimentos etanólicos no experimento anterior (6 atmosferas; 0,15g% de extrato de levedura), acompanhou-se o consumo de CR quantitativamente, através da reação de Somogyi-Nelson, e qualitativamente pela análise por g.l.c. de seus acetatos de alditóis.

A figura 21 nos mostra o perfil de consumo de monossacarídeos durante a fermentação.

No tempo zero do processo fermentativo, a proporção entre L-arabinose : D-xilose : D-manose : D-galactose : D-glucose é de 8,3 : 34,0 : 27,0 : 20,5 : 10,2 . Com 24 horas de fermentação, detecta-se como carboidratos no meio, L-arabinose : D-xilose : D-galactose em proporções de 21,6 : 55,4 : 23,1.

Após 48 horas de fermentação, a concentração de açúcares redutores de 0,35g% é representada exclusivamente por L-arabinose e D-xilose.

Portanto a levedura Pachysolen tannophilus, consome inicialmente a D-manose e D-glucose, seguida pela D-galactose e finalmente consome as duas pentoses.

TABELA XVIII - Composição qualitativa em monossacarídeos, obtida por g.l.c., de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus obtidos com 0,5% v/v de  $H_3PO_4$  a 2 e 6 atmosferas de pressão.

Monossacarídeo	Pressão empregada	
	2 atmosferas	6 atmosferas
<u>L</u> -arabinose	14,20%	8,30%
<u>D</u> -xilose	29,41%	34,00%
<u>D</u> -manose	30,69%	27,00%
<u>D</u> -galactose	14,29%	20,50%
<u>D</u> -glucose	10,56%	10,20%

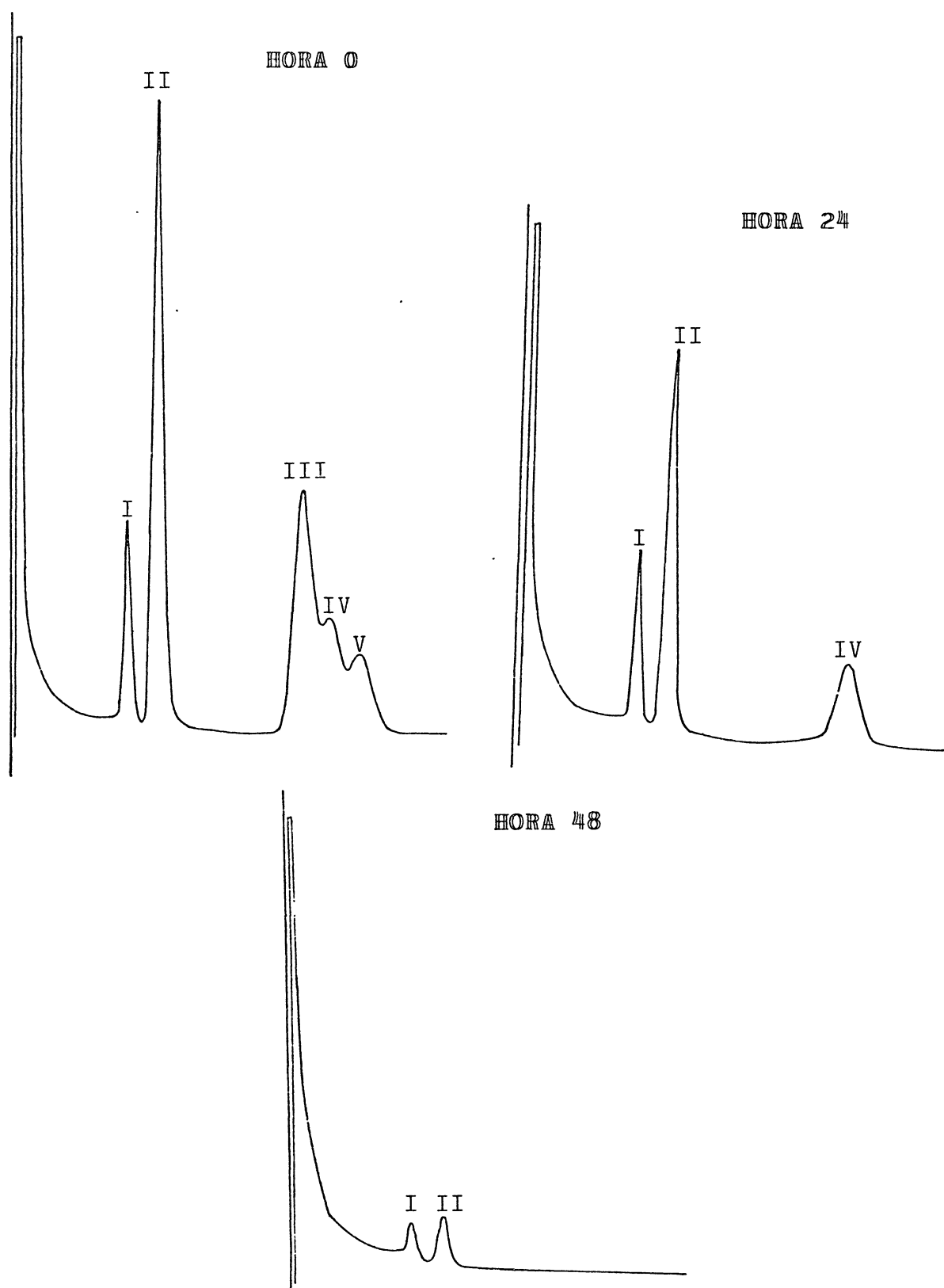


FIGURA 21: Análise qualitativa por g.l.c. do perfil de açúcares (na forma de acetatos de alditóis), presentes durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus (6atm;  $H_3PO_4$  a 0,5% v/v) com a levedura Pachysolen tannophilus.

I = Arabinitol penta-O-acetato; II = Xilitol penta-O-acetato; III = Manitol hexa-O-acetato; IV = Galactitol hexa-O-acetato e V = glucitol hexa-O-acetato.

20. Comparação da habilidade fermentativa das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6 em solução de D-xilose p.a. ou em hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana e serragem de Pinus.

O crescimento das quatro leveduras, obtido comparativamente em solução de D-xilose (CR = 4,23g%) e em hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas) de bagaço de cana (CR = 4,66g%) e de Pinus (CR = 4,21g%) está representado na tabela XIX-A.

Após 72 horas de fermentação, houve um aumento na concentração celular das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, quando crescidas em solução de D-xilose, de 2,75, 2,17, 1,83 e 1,84 unidades de absorbância, em relação à  $DO_{650nm}$  inicial (assumida como representando a concentração de inóculo somada à cor do próprio meio de fermentação).

Quando a fonte de carbono estava representada pelo hidrolisado de cana, este aumento verificado na concentração celular foi de 2,0, 0,87, 0,29 e 0,23 respectivamente, para as leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6. Os valores equivalentes obtidos quando o hidrolisado usado foi o de Pinus, foram de 2,21, 1,01, 0,36 e 0,30.

Em solução de D-xilose, após 56 horas de fermentação, a levedura que apresentou melhor produção de etanol foi a do gênero Pichia, com rendimentos de 0,375g etanol/g D-xilose consumida, seguida pela Candida com 0,318g etanol/g D-xilose consumida e finalmente pelas duas variedades de Pachysolen tannophilus com rendimentos de 0,25g etanol/g D-xilose consumida.

As duas leveduras que se mostraram mais eficientes na conversão da D-xilose p.a., a saber Pichia stipitis 6 e Candida shehatae 1, produziram quando em hidrolisados fosfóricos, tanto de cana como de Pinus, uma quantidade reduzida de etanol (tabela XIX-D).

TABELA XIX - Comparação da habilidade fermentativa das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, em soluções de D-xilose p.a. ou hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ou serragem de Pinus ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrados).

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Leveduras	Substratos	Tempo de fermentação (horas)						
		0	9	24	30	48	56	72
<u>Pachysolen tannophilus</u>	<u>D</u> -xilose p.a.	0,30	0,58	1,57	1,85	2,70	2,87	3,05
	Hidrolisado de cana	0,70	0,81	1,07	1,19	1,82	2,10	2,70
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0,59	0,76	1,25	1,37	1,95	2,22	2,80
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	<u>D</u> -xilose p.a.	0,25	0,60	1,46	1,62	2,30	2,42	2,42
	Hidrolisado de cana	0,63	0,73	0,87	0,88	1,19	1,21	1,50
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0,54	0,73	1,07	1,10	1,20	1,35	1,55
<u>Candida shehatae</u> 1	<u>D</u> -xilose p.a.	0,09	0,15	1,05	1,24	1,81	1,82	1,92
	Hidrolisado de cana	0,47	0,60	0,65	0,63	0,72	0,69	0,76
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0,40	0,52	0,62	0,60	0,70	0,70	0,76
<u>Pichia stipitis</u> 6	<u>D</u> -xilose p.a.	0,08	0,34	1,47	1,62	1,60	1,72	1,92
	Hidrolisado de cana	0,46	0,50	0,52	0,52	0,62	0,62	0,69
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0,40	0,46	0,54	0,54	0,65	0,64	0,70

B) CARBOHIDRATOS TOTAIS (g%)

Leveduras	Substratos	Tempo de fermentação (horas)						
		0	9	24	30	48	56	72
<u>Pachysolen tannophilus</u>	<u>D</u> -xilose p.a.	4,35	4,15	2,88	2,32	0,46	0,14	0,12
	Hidrolisado de cana	5,05	4,66	4,47	4,46	4,03	3,86	3,35
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,64	4,27	4,34	2,82		1,69	1,53
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	<u>D</u> -xilose p.a.	4,35	4,15	2,70	2,00	0,61	0,24	0,13
	Hidrolisado de cana	5,05	4,57	4,36	4,29	4,20	4,20	3,91
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,64	4,22	3,09	2,82	2,50	2,28	2,02
<u>Candida shehatae</u> 1	<u>D</u> -xilose p.a.	4,35	4,20	4,21	1,11	0,10	0,61	0,06
	Hidrolisado de cana	5,05	4,70	4,54	4,49	4,24	4,45	4,62
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,64	4,20	3,99	4,20	4,20	4,04	4,24
<u>Pichia stipitis</u> 6	<u>D</u> -xilose p.a.	4,35	4,01	1,24	0,18	0,06	0,04	0,03
	Hidrolisado de cana	5,05	4,96	4,68	4,78	4,87	4,91	4,91
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,64	4,36	4,41	4,59	4,67	4,59	

C) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Leveduras	Substratos	Tempo de fermentação (horas)						
		0	9	24	30	48	56	72
<u>Pachysolen tannophilus</u>	<u>D</u> -xilose p.a.	4,23	3,90	2,67	2,11	0,39	0,06	0,01
	Hidrolisado de cana	4,95	4,52	4,24	4,21	3,84	3,61	3,14
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,21	4,12	3,20	2,55		0,94	0,69
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	<u>D</u> -xilose p.a.	4,23	3,52	2,68	1,88	0,50	0,16	0,01
	Hidrolisado de cana	4,95	4,29	4,27	4,24	4,19	4,17	3,91
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,21	3,75	2,62	2,50	1,82	1,53	1,19
<u>Candida shehatae</u> 1	<u>D</u> -xilose p.a.	4,23	4,04	2,11	1,04	0,10	0,03	0,02
	Hidrolisado de cana	4,95	4,55	4,64	4,73	4,55	4,71	4,73
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,21	4,34	4,39	4,42	4,47	4,39	4,30
<u>Pichia stipitis</u> 6	<u>D</u> -xilose p.a.	4,23	3,61	1,03	0,11	0,02	0,02	0,02
	Hidrolisado de cana	4,95	4,82		4,87	4,79	4,90	4,79
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	4,21		4,41	4,29	4,46	4,41	4,45



## D) ETANOL (g%)

Leveduras	Substratos	Tempo de fermentação (horas)						
		0	9	24	30	48	56	72
<u>Pachysolen tannophilus</u>	<u>D</u> -xilose p.a.	0	0	0,230	0,389	0,894	1,070	0,817
	Hidrolisado de cana	0	0	0,061	0,084	0,100	0,160	0,200
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0	0,038	0,661	0,700	0,753	0,888	0,824
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	<u>D</u> -xilose p.a.	0	0	0,264	0,345	0,942	1,037	0,808
	Hidrolisado de cana	0	0	0	0,015	0,030	0,024	0,016
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0	0,076	0,623	0,646	0,784	0,872	0,784
<u>Candida shehatae</u> 1	<u>D</u> -xilose p.a.	0	0	0,650	0,908	1,310	1,340	1,19
	Hidrolisado de cana	0	0	0	0	0	0,016	0
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0	0	0	0	0	0,024	0,016
<u>Pichia stipitis</u> 6	<u>D</u> -xilose p.a.	0	0,088	1,270	1,340	1,440	1,580	1,360
	Hidrolisado de cana	0	0	0	0	0	0	0,064
	Hidrolisado de <u>Pinus</u>	0	0	0	0	0	0	0

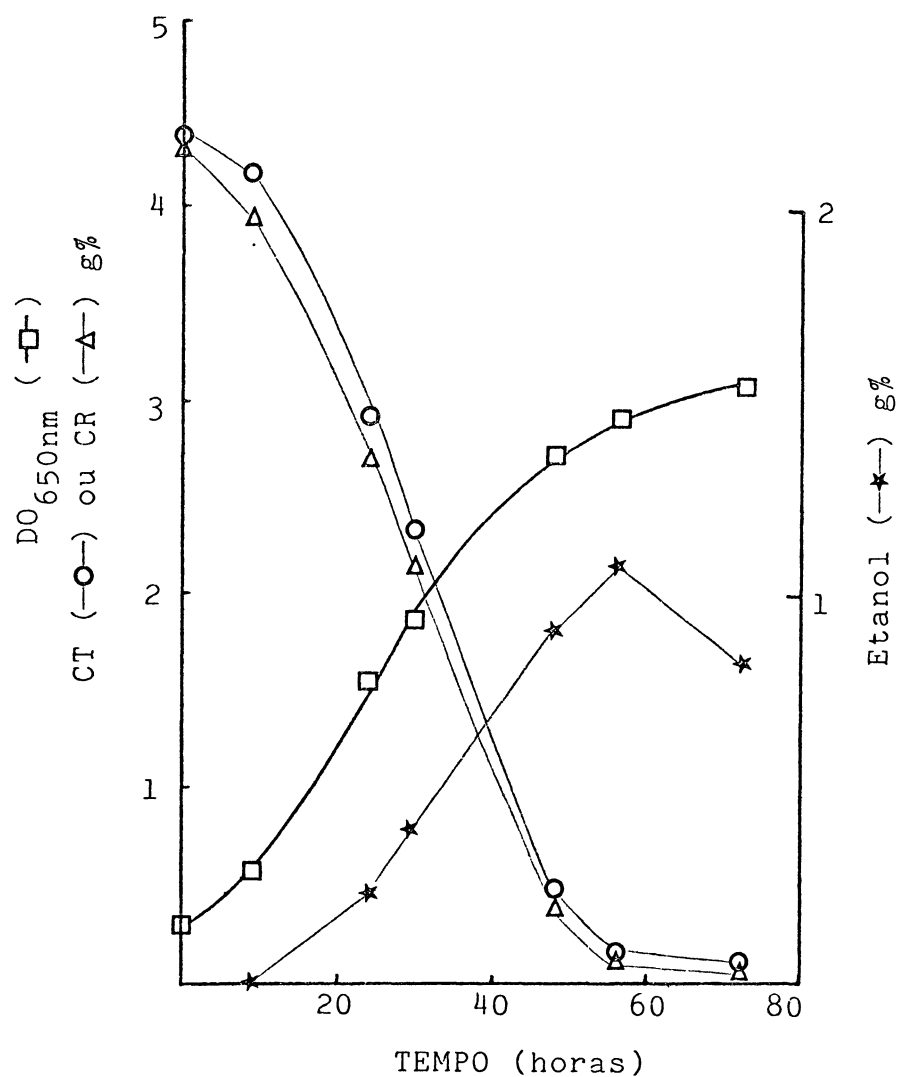


FIGURA 22: Fermentação de uma solução de D-xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 72 horas, com DO<sub>650nm</sub> = 7,2.

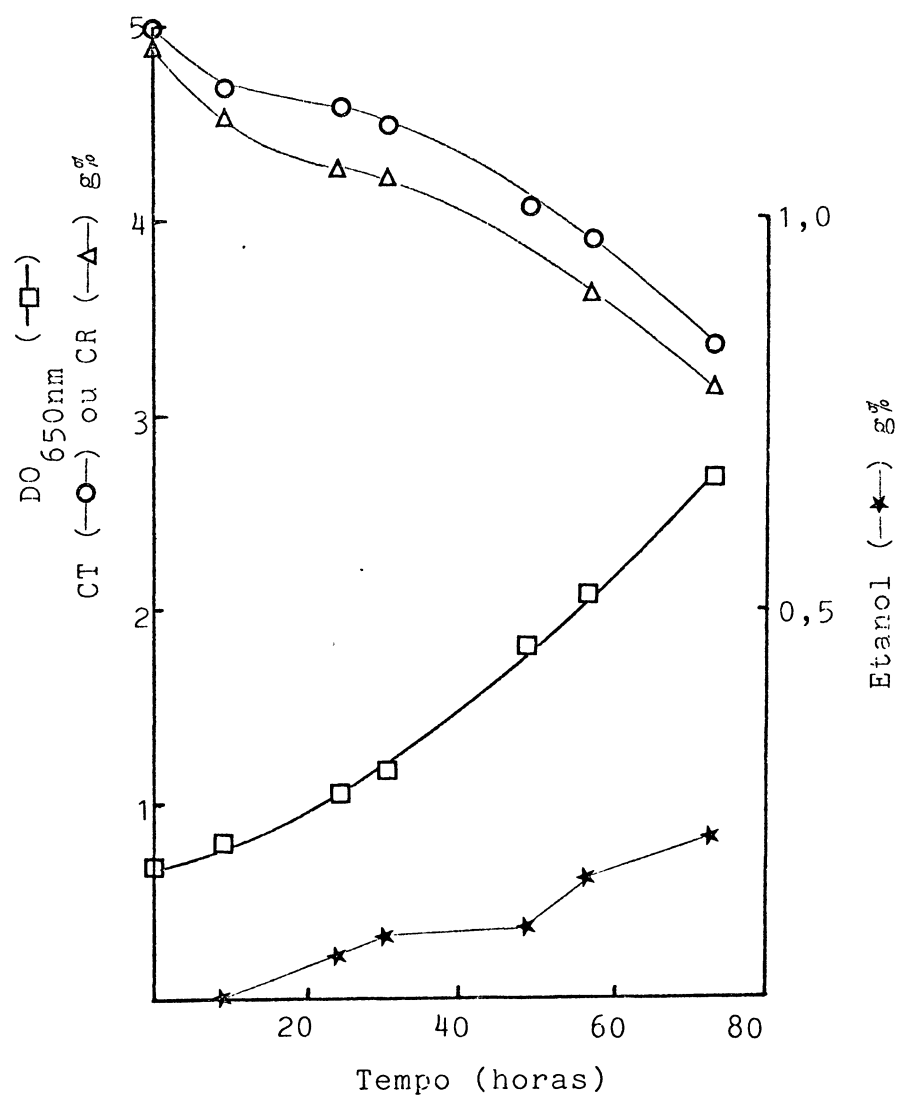


FIGURA 23: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 72 horas, com  $DO_{650nm} = 7,2$ .

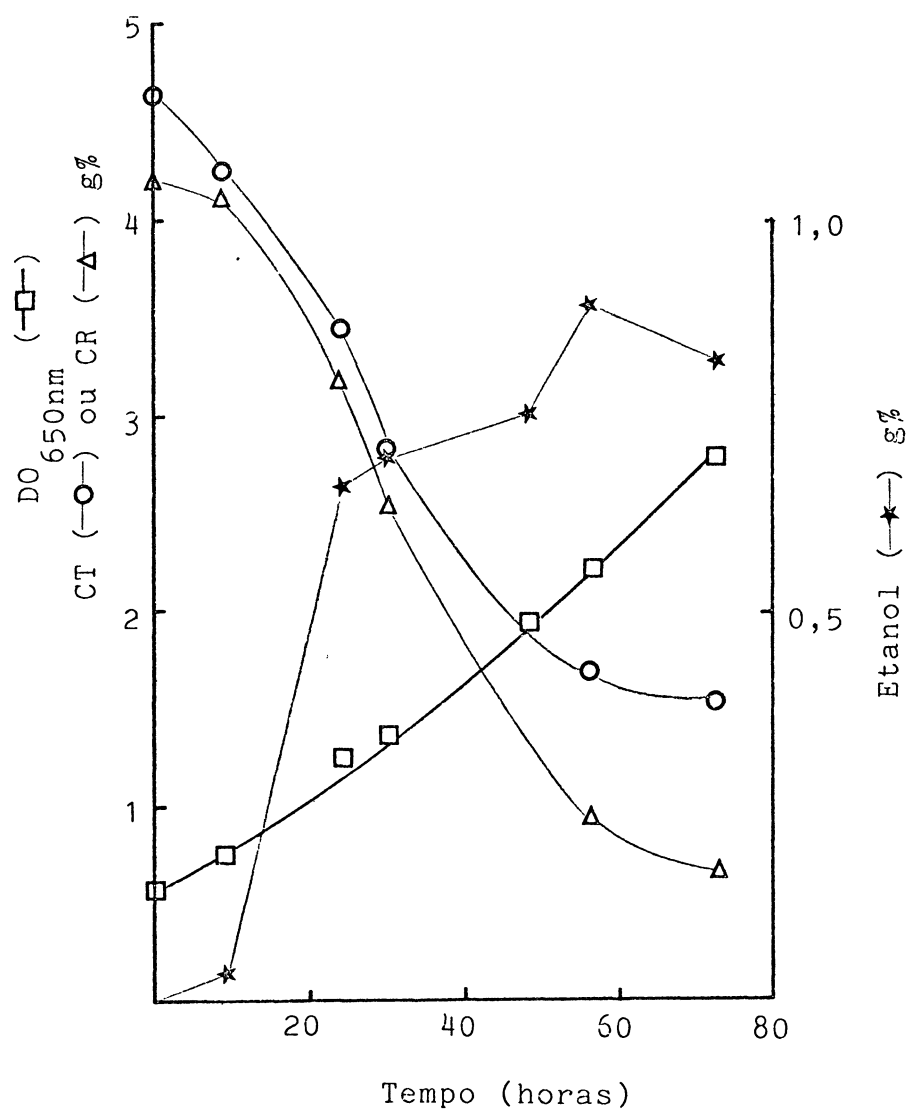


FIGURA 24: Fermentação de hidrolisado fosfórico de serragem de *Pinus* ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura *Pachysolen tannophilus*.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 72 horas, com  $DO_{650nm} = 7,2$ .

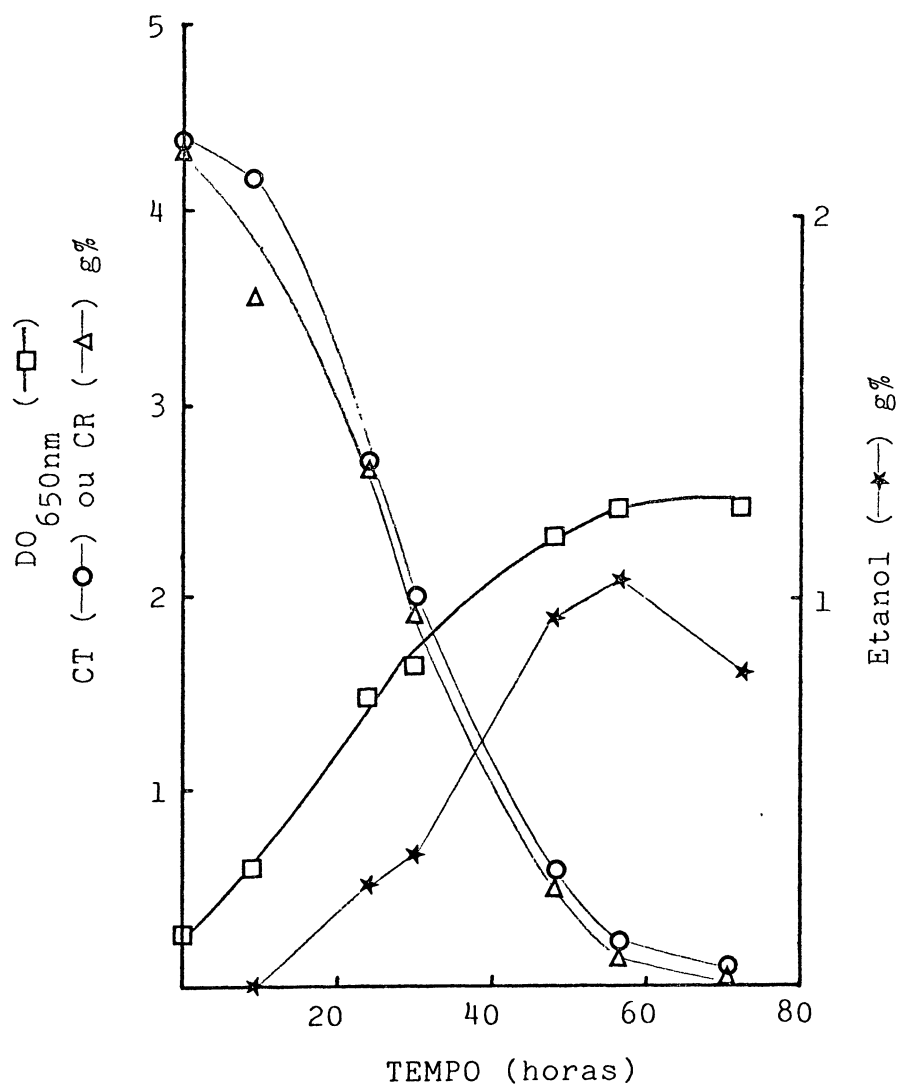


FIGURA 25: Fermentação de uma solução de D-xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, com a levedura Pachysolen tan-nophilus 2.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 72 horas, com DO<sub>650nm</sub> = 6,0.

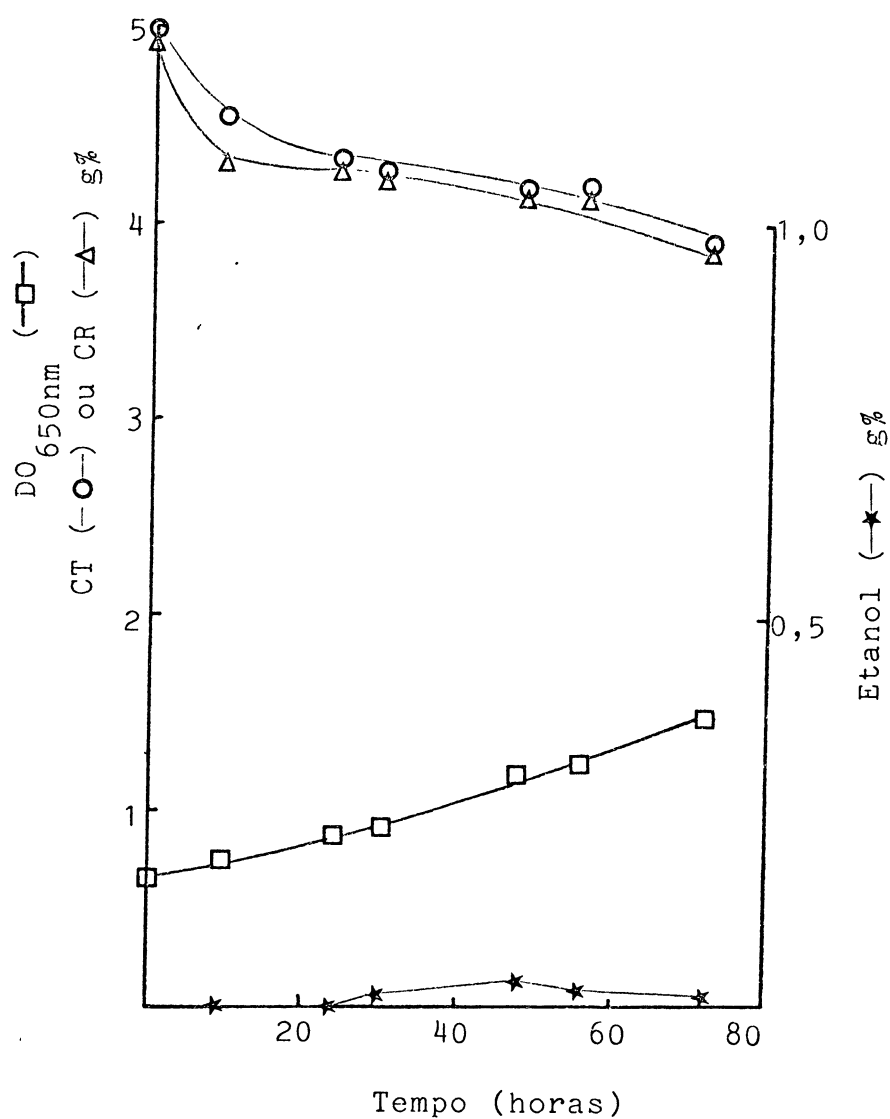


FIGURA 26: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus 2.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 72 horas, com  $\text{DO}_{650\text{nm}} = 6,0$ .

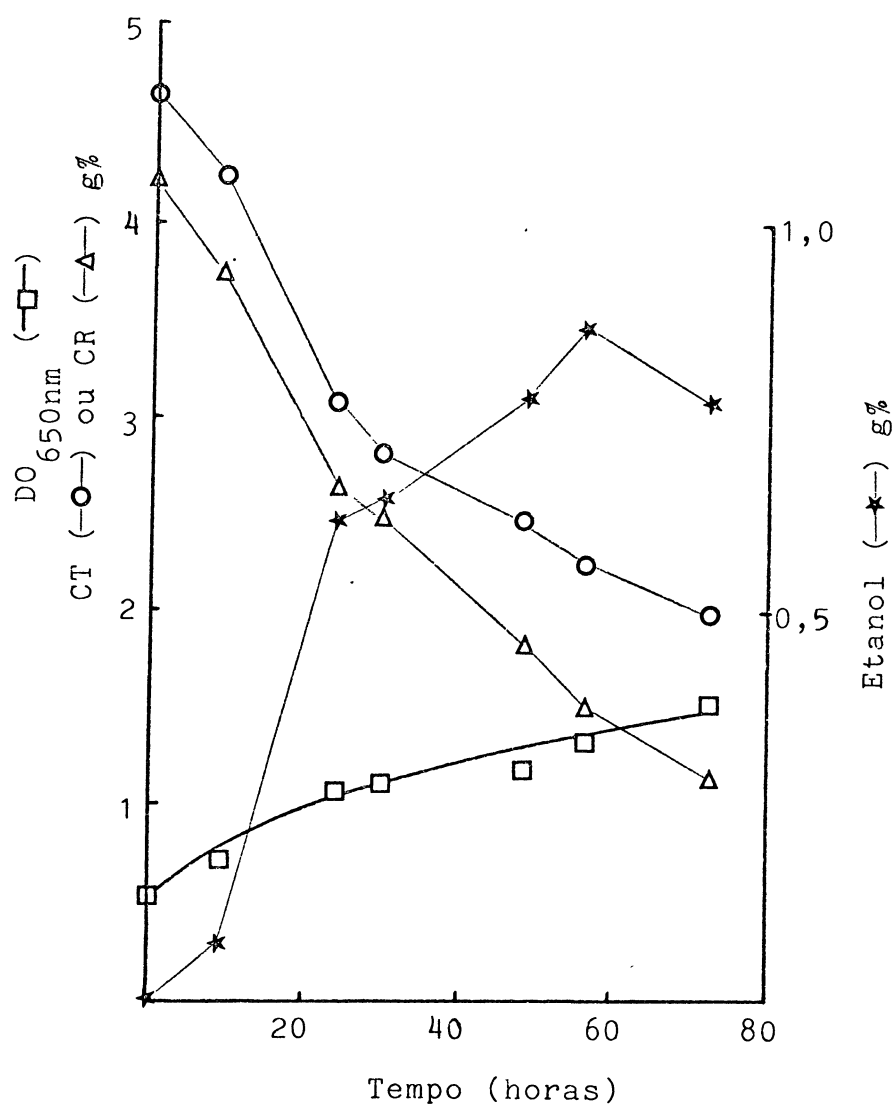


FIGURA 27: Fermentação de hidrolisado fosfórico de serragem de *Pinus* ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura *Pachysolen tannophilus* 2.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no ítem 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 2ml de cultura de 72 horas, com  $DO_{650nm} = 6,0$

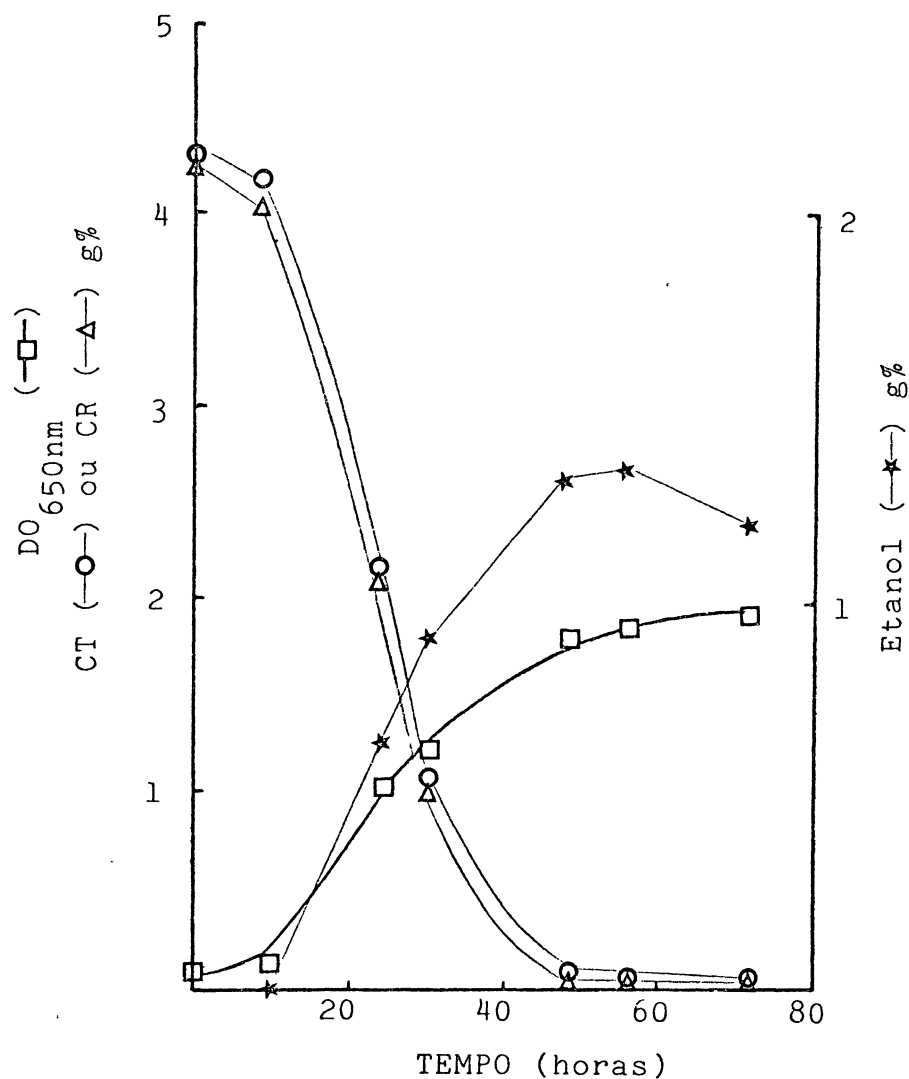


FIGURA 28: Fermentação de uma solução de D-xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Candida shehatae 1.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 0,6ml de cultura de 72 horas, com  $DO_{650nm} = 6,7$ .



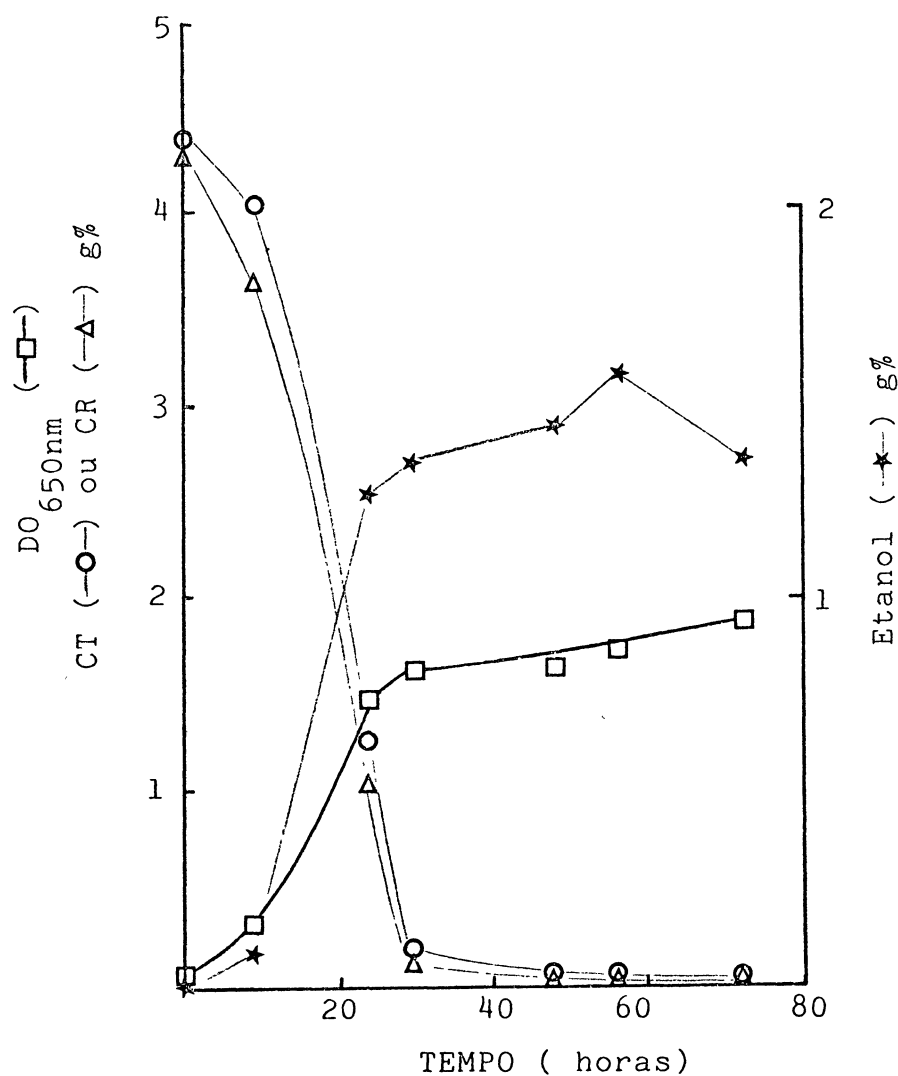


FIGURA 29: Fermentação de uma solução de D-xilose a 4,5g%, suplementada com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pichia stipitis 6.

O cultivo de 50ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.5. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 72 horas, com  $DO_{650nm} = 3,18$ .

A levedura Pachysolen tannophilus em hidrolisados de cana, após 72 horas de fermentação, quando apenas 36,5% do carboidrato redutor inicialmente presente havia sido consumido, produziu 0,11g etanol/g D-xilose consumida. Esta mesma levedura, mesmo não tendo apresentado um aumento significativo na concentração celular em relação ao hidrolisado de cana, quando cultivada em hidrolisado de Pinus, teve o pico de produção de etanol às 56 horas de fermentação com um rendimento de 0,27g/g D-xilose consumida.

A mutante da mesma levedura, Pachysolen tannophilus 2 já teve um comportamento diverso. Em hidrolisado de cana, a produção de etanol foi mínima, ao passo que em Pinus, com praticamente o mesmo crescimento observado para o caso anterior, houve uma produção de etanol de 0,872g%, o que equivale a 0,32g/g D-xilose consumida ao final de 56 horas de fermentação.

As concentrações de furfural nos hidrolisados fosfóricos de cana e de Pinus, foram de 0,092 e 0,041g%, respectivamente.

21. Comparação da habilidade fermentativa das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6 em hidrolisados fosfóricos de cana, clarificados de compostos fenólicos.

Com a constatação prévia de que o furfural, também formado durante a hidrólise fosfórica, pode ser eficientemente extraído com clorofórmio e carvão ativo (tabela VI), o efeito da extração de hidrolisados fosfóricos de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas) com clorofórmio e carvão ativo, na posterior fermentação pelas 4 leveduras acima mencionadas, pode ser avaliado através da análise da tabela XX.

Partindo de uma mesma concentração celular inicial, a levedura Pachysolen tannophilus apresentou após 117 horas de fermentação,  $DO_{650nm}$  de 4,34, 4,37 e 3,99 respectivamente, para o hidrolisado controle (sem tratamento), hidrolisado extraído com clorofórmio e hidrolisado tratado com carvão ativo. Um

TABELA XX - Comparação da habilidade fermentativa das leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, em hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrados), clarificados de compostos fenólicos.

A) DENSIDADE ÓTICA (650nm)

Leveduras	Tratamentos	Tempo de fermentação (horas)							
		0	18	26	42	51	69	93	117
<u>Pachysolen tannophilus</u>	-	0,54	1,05	1,35	2,15	2,62	3,32	4,02	4,34
	Clorofórmio	0,52	1,15	1,52	2,35	2,75	3,17	3,92	4,37
	Carvão ativo	0,32	1,05	1,45	2,55	2,85	3,32	3,92	3,99
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	-	0,48	0,84	0,95	1,22	1,42	1,65	1,72	2,12
	Clorofórmio	0,44	0,90	1,03	1,32	1,45	1,68	1,98	2,36
	Carvão ativo	0,25	0,80	1,48	1,42	1,52	1,68	1,73	1,75
<u>Candida shehatae</u> 1	-	0,51	0,69	0,67	0,80	0,76	0,90	0,85	1,02
	Clorofórmio	0,49	0,57	0,57	0,64	0,66	0,70	0,77	0,84
	Carvão ativo	0,29	0,30	0,28	0,41	0,60	1,15	1,75	2,62
<u>Pichia stipitis</u> 6	-	0,58	0,67	0,64	0,65	0,70	0,82	0,83	0,99
	Clorofórmio	0,55	0,65	0,56	0,67	0,69	0,75	1,11	2,92
	Carvão ativo	0,41	0,37	0,35	0,71	1,30	2,52	3,04	3,64

B) CARBOHIDRATOS TOTAIS (g%)

Leveduras	Tratamentos	Tempo de fermentação (horas)							
		0	18	26	42	51	69	93	117
<u>Pachysolen tannophilus</u>	-	3,78	3,16	3,12	2,21	1,84	1,16	0,53	0,39
	Clorofórmio	3,76	3,01	2,76	2,09	1,46	0,84	0,42	0,36
	Carvão ativo	3,31	2,28	2,11	1,40	0,47	0,34	0,30	0,26
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	-	3,78	3,33	3,08	2,32	2,21	2,04	1,59	1,27
	Clorofórmio	3,76	2,83	2,70	1,16	1,85	1,49	0,94	0,62
	Carvão ativo	3,31	2,19	2,11	1,37	0,95	0,55	0,43	0,33
<u>Candida shehatae</u> 1	-	3,78	3,66	3,54	3,71	3,45	3,42	3,53	3,64
	Clorofórmio	3,76	3,45	3,61	3,85	3,57	3,61	3,77	3,72
	Carvão ativo	3,31	2,91	3,05	3,33	3,04	0,78	0,38	0,32
<u>Pichia stipitis</u> 6	-	3,78	3,70	3,49	3,80	3,58	3,65	3,74	3,76
	Clorofórmio	3,76	3,45	3,46	3,62	3,52	3,61	3,61	1,99
	Carvão ativo	3,31	3,08	3,26	3,12	1,85	0,47	0,31	0,28

C) CARBOHIDRATOS REDUTORES (g%)

Leveduras	Tratamentos	Tempo de fermentação (horas)							
		0	18	26	42	51	69	93	117
<u>Pachysolen tannophilus</u>	-	3,56	3,00	2,92	2,06	1,77	0,98	0,37	0,25
	Clorofórmio	3,63	2,73	2,68	1,83	1,33	0,60	0,23	0,19
	Carvão ativo	3,19	2,25	1,99	0,70	0,23	0,13	0,08	0,08
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	-	3,56	3,00	2,29	2,18	2,10	1,91	1,45	1,25
	Clorofórmio	3,63	2,76	2,47	2,05	1,74	1,22	0,69	0,46
	Carvão ativo	3,19	2,10	1,87	1,16	0,79	0,41	0,21	0,16
<u>Candida shehatae</u> 1	-	3,56	3,30	3,47	3,58	3,35	3,41	3,42	3,91
	Clorofórmio	3,63	3,18	3,44	3,62	3,33	3,55	3,52	3,50
	Carvão ativo	3,19	2,76	2,90	3,04	2,54	0,73	0,26	0,17
<u>Pichia stipitis</u> 6	-	3,56	3,30	3,47	3,54	3,57	3,52	3,42	3,47
	Clorofórmio	3,63	3,40	3,49	3,49	3,37	3,50	3,55	1,87
	Carvão ativo	3,19	3,01	3,21	2,76	1,81	0,33	0,22	0,17

## D) ETANOL (g%)

Leveduras	Tratamentos	Tempo de fermentação (horas)							
		0	18	26	42	51	69	93	117
<u>Pachysolen tannophilus</u>	-	0	0,10	0,13	0,17	0,19	0,21	0,10	0
	Clorofórmio	0	0,15	0,16	0,28	0,28	0,30	0,13	0
	Carvão ativo	0	0,18	0,20	0,40	0,39	0,28	0	0
<u>Pachysolen tannophilus</u> 2	-	0	0,07	0,08	0,09	0,07	0,06	0,03	0
	Clorofórmio	0	0,17	0,18	0,22	0,23	0,21	0,19	0
	Carvão ativo	0	0,23	0,26	0,37	0,40	0,28	0,06	0
<u>Candida shehatae</u> 1	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clorofórmio	0	0,11	0,15	0,11	0,05	0,04	0	0
	Carvão ativo	0	0,13	0,15	0,16	0,17	0,75	0,56	0,08
<u>Pichia stipitis</u> 6	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	Clorofórmio	0	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,45
	Carvão ativo	0	0,13	0,16	0,18	0,48	0,74	0,31	0

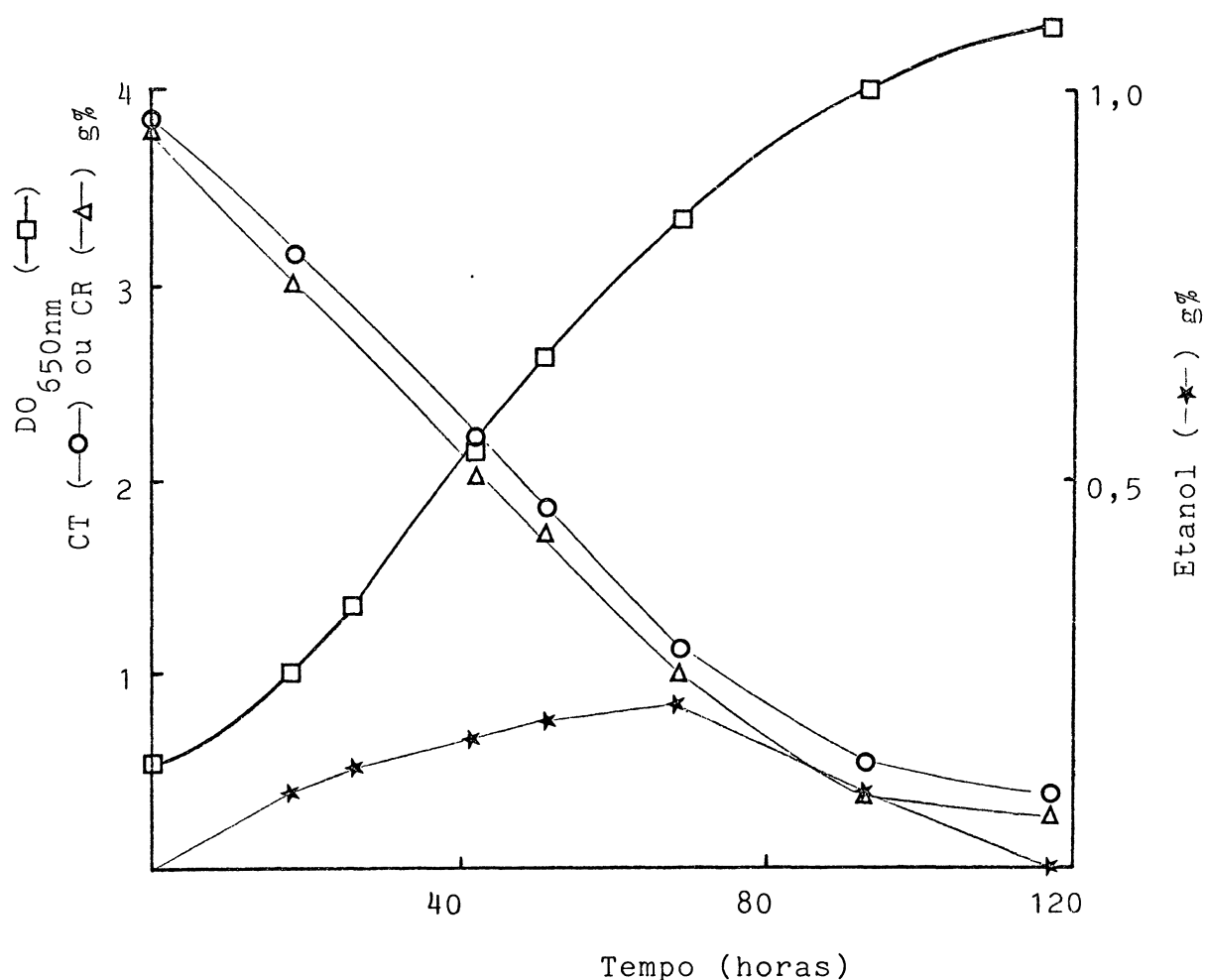


FIGURA 30: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), sem prévia clarificação e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 8,47$ .

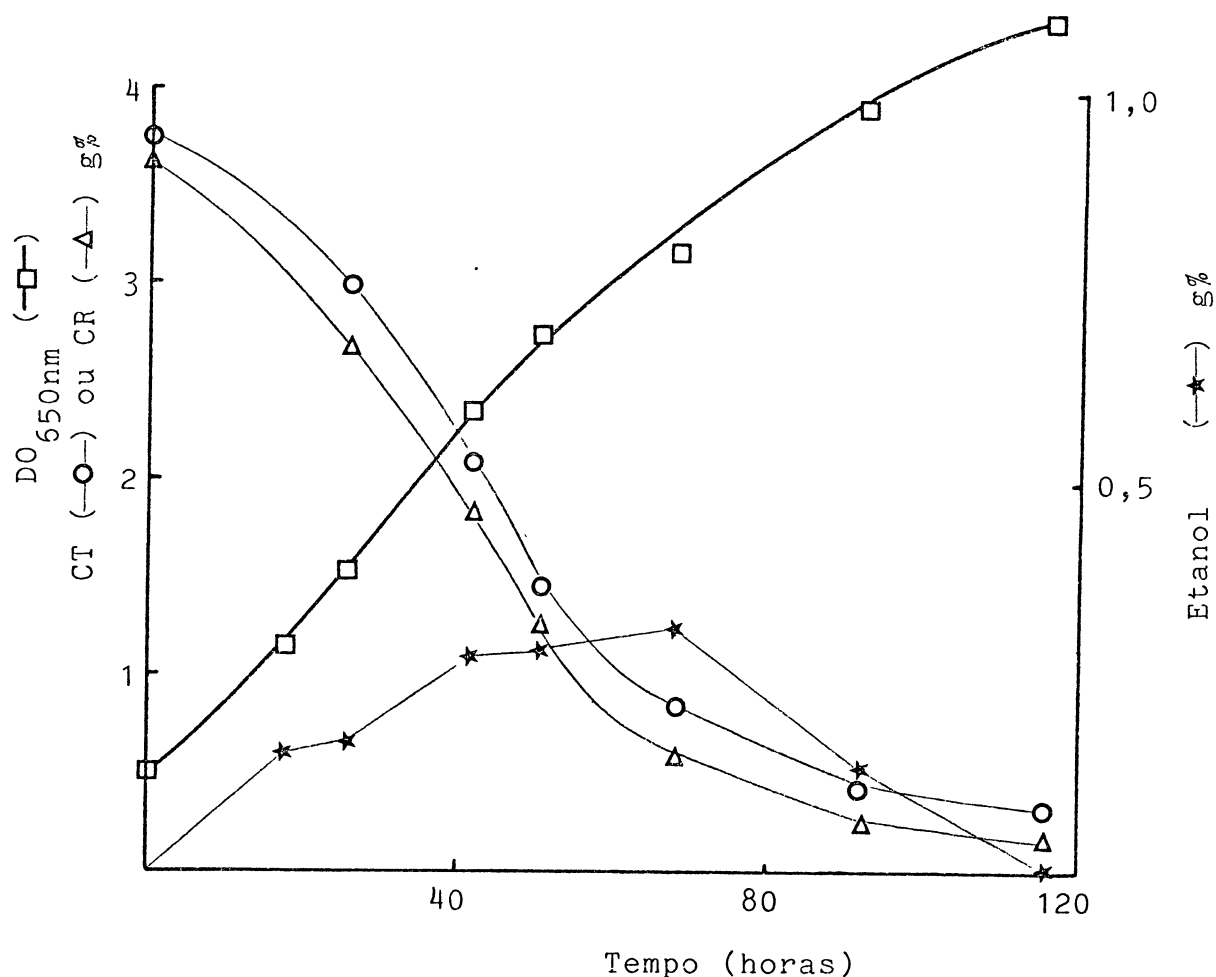


FIGURA 31: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), tratado com clorofórmio e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 8,47$ .



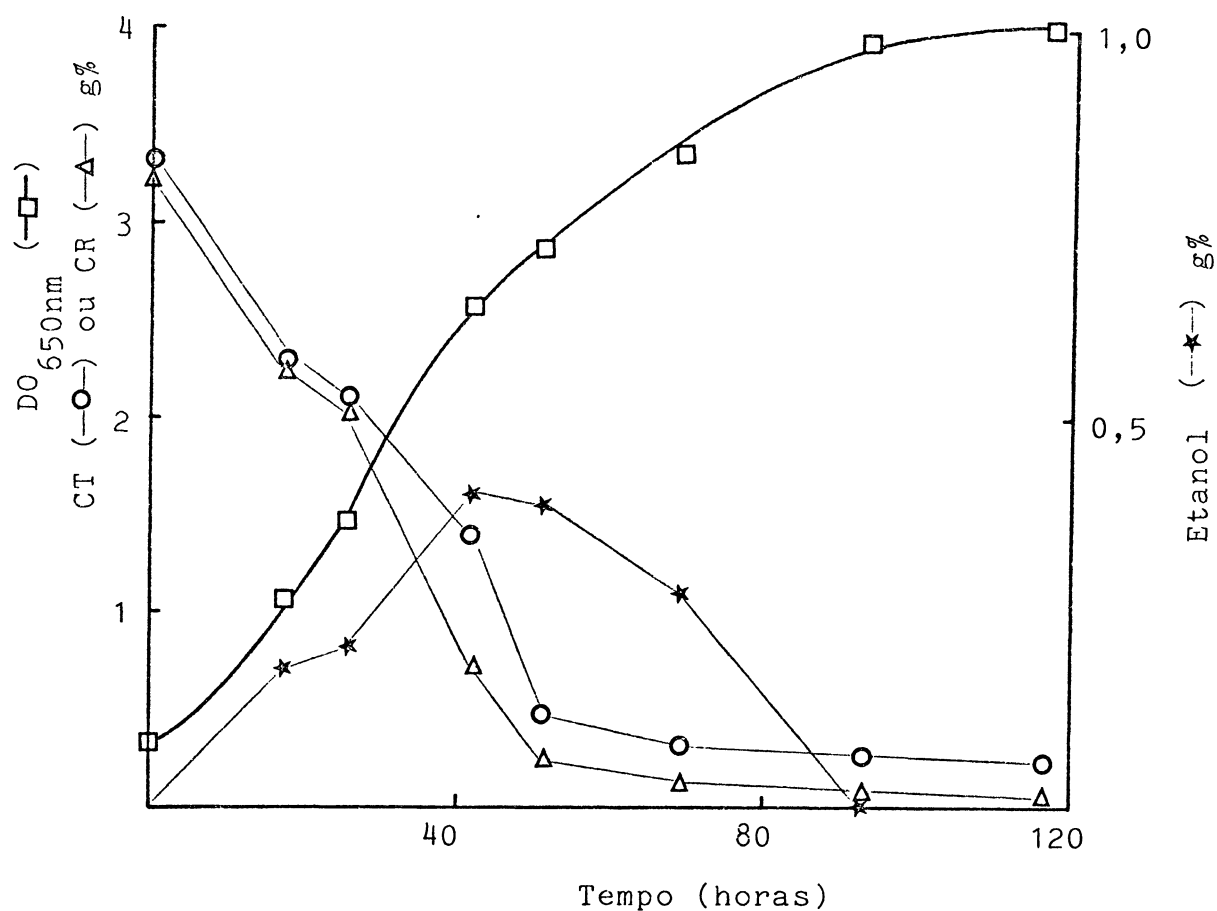


FIGURA 32: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com DO<sub>650nm</sub> = 8,47.

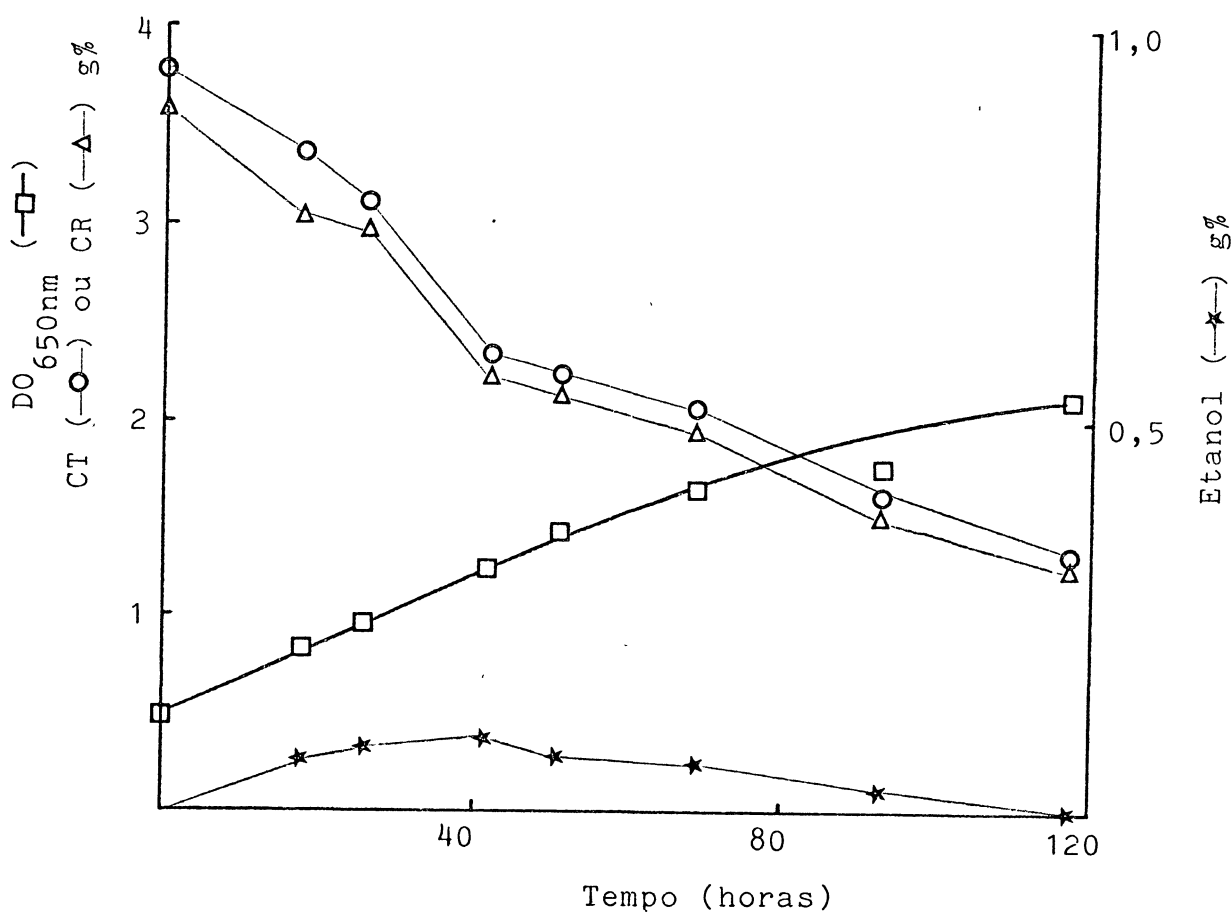


FIGURA 33: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), sem prévia clarificação e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus 2.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 6,45$ .

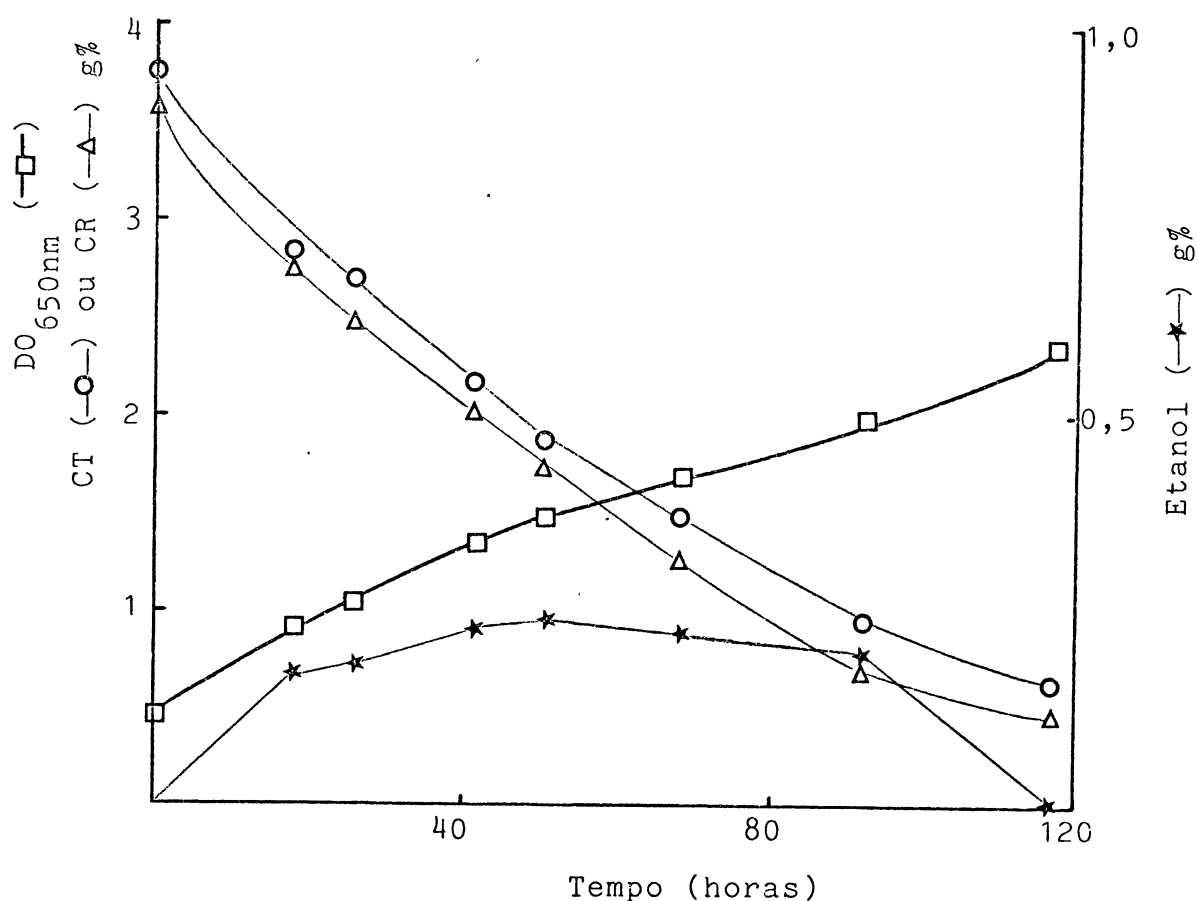


FIGURA 34: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), tratado com clorofórmio e suplementado com 0,5ml% da solução de V0gel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus 2.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 6,45$ .

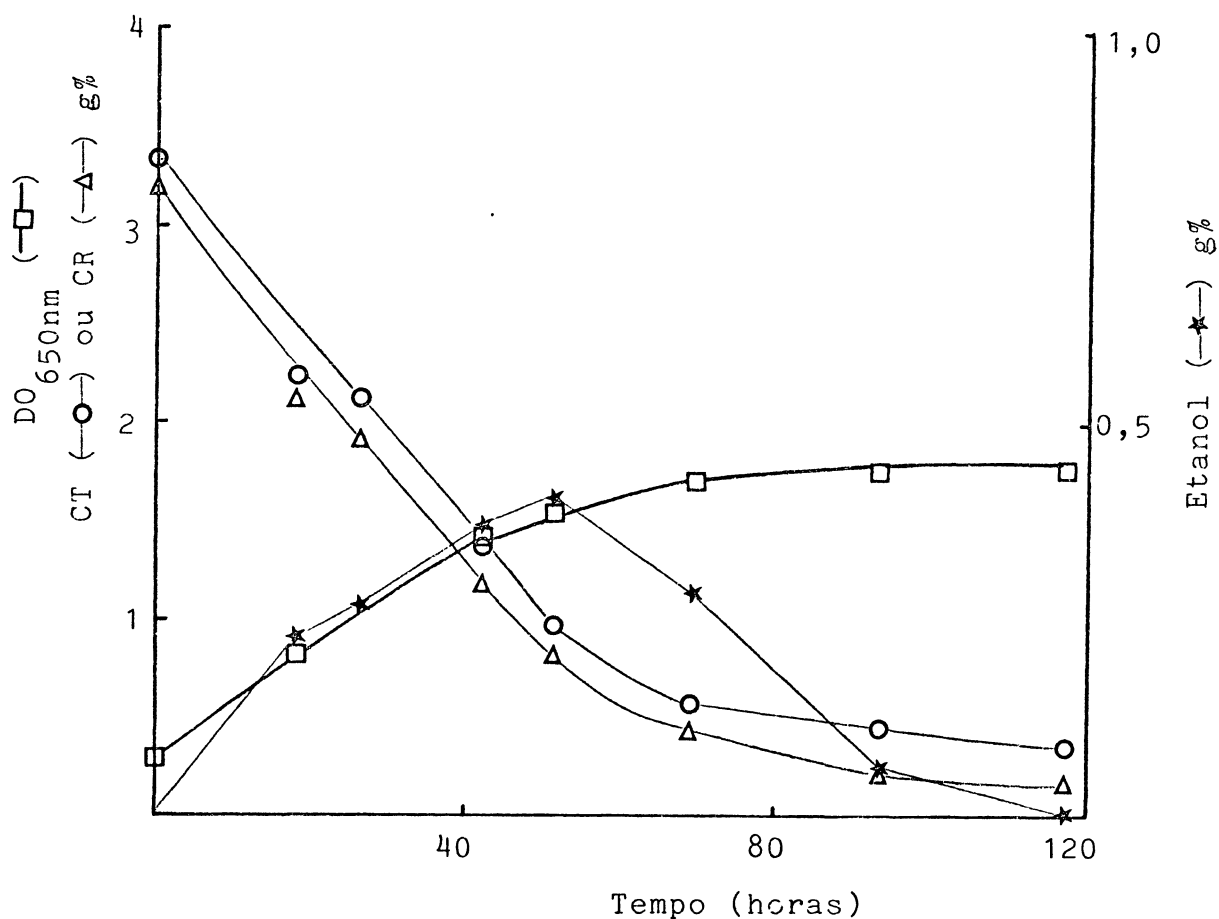


FIGURA 35: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Pachysolen tannophilus 2.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 6,45$ .

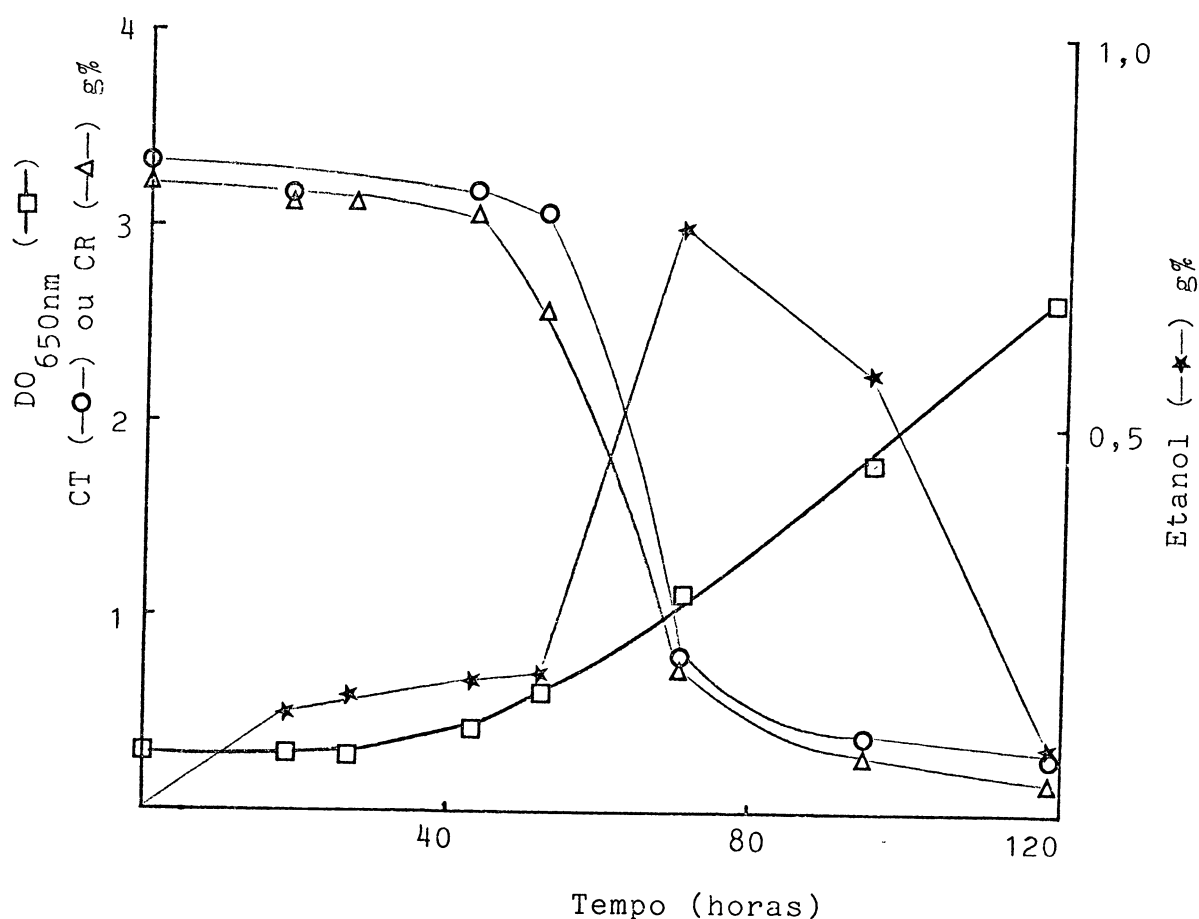


FIGURA 36: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura Candida shehatae 1.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 7,8$ .

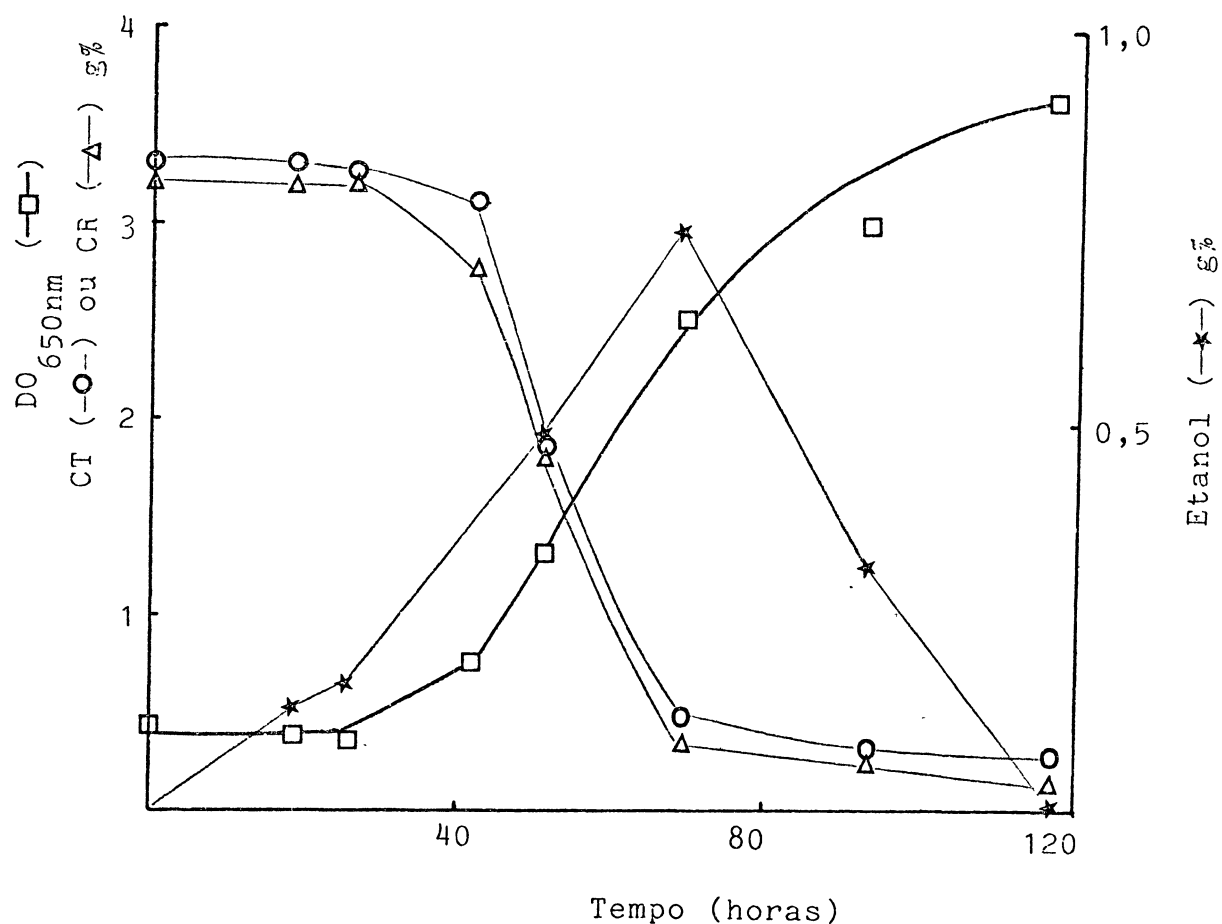


FIGURA 37: Fermentação de hidrolisado fosfórico de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atmosferas; 2 vezes concentrado), tratado com carvão ativo e suplementado com 0,5ml% da solução de Vogel e 0,1g% de extrato de levedura, pela levedura *Pichia stipitis* 6.

O cultivo de 25ml preparado como descrito no item 2.5.5.2.6. de Materiais e Métodos, foi inoculado com 1ml de cultura de 54 horas, com  $DO_{650nm} = 8,92$ .

perfil muito semelhante foi verificado com a multiplicação da levedura Pachysolen tannophilus 2. A extração do hidrolisado com clorofórmio aumenta o crescimento celular ( $DO = 2,36$ ), porém o tratamento com carvão resulta em crescimento celular menor ( $DO = 1,75$ ) do que aquele obtido no hidrolisado sem prévio tratamento ( $DO = 2,12$ ) (tabela XIX-A).

Confirmando os dados da experiência anterior, a levedura Pachysolen tannophilus em hidrolisado de cana sem tratamento, formou apenas 0,21g% de etanol em 69 horas de fermentação, com um rendimento de 0,08g/g D-xilose consumida.

Este rendimento é aumentado para 0,10 e 0,16g etanol/g D-xilose consumida, pelo tratamento do hidrolisado com clorofórmio ou carvão ativo (tabela XIX-D).

A levedura Pachysolen tannophilus 2 forma quantidades insignificantes de etanol em hidrolisado sem tratamento, mas quando este é previamente tratado com clorofórmio ou carvão ativo, obtém-se rendimentos etanólicos de 0,121 e 0,166g etanol/g D-xilose consumida, respectivamente.

Portanto, o tratamento com carvão ativo apesar de diminuir o teor de CR do hidrolisado e propiciar uma diminuição na quantidade de biomassa microbiana formada, aumenta os rendimentos etanólicos durante o processo fermentativo de hidrolisado de cana.

A metabolização do etanol produzido ocorreu em todos os cultivos, sendo acompanhada, no caso da levedura Pachysolen tannophilus 2, da produção de quantidades crescentes de ácido acético nas amostras de 93 e 117 horas, quando a mesma foi cultivada em hidrolisado de cana tratado com carvão.

Quando a levedura Candida shehatae 1 foi inoculada em hidrolisado de cana sem prévio tratamento, ocorreu um leve crescimento celular ao final de 117 horas de incubação, durante os quais não se constatou a presença do etanol nos meios fermentados. O tratamento prévio deste hidrolisado com clorofórmio proporcionou uma multiplicação ainda menor, porém acompanhada da produção de 0,15g% de etanol após 26 horas de fermentação.

A fermentação de hidrolisado, previamente extraído

com carvão ativo, apresentou após uma lag fase de 42 horas, uma vigorosa multiplicação da levedura Candida shehatae 1 e produção de etanol de 0,75g% na amostra de 69 horas.

Para a levedura Pichia stipitis 6, tanto o pré-tratamento com clorofórmio como com o carvão, melhoraram a multiplicação celular.

Obtiveram-se valores de DO correspondentes a 2,92 e 3,64 respectivamente, ambos maiores àquele observado para o hidrolisado sem tratamento. Este pequeno crescimento obtido no hidrolisado sem tratamento (DO = 0,99), não foi acompanhado da produção de etanol em nenhuma das amostras coletadas.

O tratamento do hidrolisado com clorofórmio, provocou após 93 horas de fermentação, uma queda acentuada no conteúdo de CR, com formação de 0,45g% de etanol na amostra final (117 horas), equivalente a um rendimento de 0,255g/g D-xilose consumida. Este rendimento é melhorado para 0,258g/g D-xilose consumida, com 69 horas de fermentação, quando do tratamento do hidrolisado com carvão ativo.

## 22. Sacarificação enzimática

Uma outra vantagem do emprego do ácido fosfórico é a alteração do estado nativo da celulose, diminuindo a cristalinidade e associação com a lignina, com vistas a uma etapa de sacarificação enzimática da celulose residual, que é o componente principal em peso, do bagaço integral. Esta alteração, catalisada pelo ácido fraco, não envolve a despolimerização da celulose.

Para esta avaliação, empregou-se preparação comercial cedida pela Bioferm S/A (celulases cruas de Trichoderma sp) nas condições de uso aconselhadas pelo fabricante: bagaço lignocelulósico a 5%, tampão acetato ou citrato 50mM a pH 4,8 e incubação a 45°C.

### 22.1. Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos de bagaço de cana e de sorgo clorados antes da hidrólise fosfórica.



A sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos remanescentes após a hidrólise fosfórica de bagaços de cana e de sorgo, previamente clorados, pode ser vista na tabela XXI.

Dos dados constantes desta tabela, pode-se concluir que a hidrólise fosfórica de bagaço de cana e de sorgo, torna o resíduo lignocelulósico mais suscetível à degradação enzimática. Quando esta hidrólise fosfórica é precedida de uma etapa de deslignificação, esta suscetibilidade à celulase é ainda mais aumentada.

Os valores de celulólise, expressos em g de carboidratos redutores liberados / 100g bagaço residual seco incubado, para os resíduos lignocelulósicos obtidos após hidrólise fosfórica de bagaço de cana, não clorados e clorados, foram de 16,0g% e 20,5g% respectivamente, valores 1,45 e 1,86 vezes superiores àquele obtido para o resíduo resultante da simples solvólise do material.

A extração do bagaço de cana não clorado, com etanolamina e etanol fervente antes da hidrólise fosfórica, diminui a eficiência da sacarificação do resíduo lignocelulósico em 25%. No entanto, quando do bagaço clorado se extrai a cloro-lignina formada, a digestibilidade do resíduo obtido após a hidrólise fosfórica do mesmo, é aumentada em 36,5% em relação à amostra clorada, não extraída.

Para o bagaço de sorgo, igualmente se conclui que a ordem de celulólise dos bagaços é a seguinte: bagaço hidrolisado clorado > bagaço hidrolisado não clorado > bagaço solvolisado.

Ainda, a extração da cloro-lignina formada, provoca um aumento de 18% no rendimento da sacarificação enzimática do resíduo obtido após a hidrólise fosfórica de bagaço de sorgo.

## 22.2. Influência da umidade do bagaço hidrolisado na sacarificação enzimática

Dos dados constantes da tabela XXII, pode-se conclu

TABELAXXI- Sacarificação enzimática de resíduos de hidrolisados fosfóricos ( $H_3PO_4$  0,5% v/v; 1 hora; 2 atmosferas) de bagaços de cana e de sorgo previamente clorados, durante 66 horas a 45°C.

Resíduo	Solvólise	Hidrólise fosfórica	Cloração	Extração da cloro-lignina	CR	CT
Cana	+	-	-	-	11,0	13,0
Cana	-	+	-	-	16,0	16,5
Cana	-	+	-	+	12,0	12,5
Cana	-	+	+	-	20,5	21,0
Cana	-	+	+	+	28,0	31,0
Sorgo	+	-	-	-	15,0	16,5
Sorgo	-	+	-	-	25,0	26,5
Sorgo	-	+	-	+	24,0	25,5
Sorgo	-	+	+	-	30,5	32,0
Sorgo	-	+	+	+	36,0	40,0

Experiência realizada conforme descrição no item 2.6.1. de Materiais e Métodos, e os valores de CR e CT estão expressos em termos de g/100g de resíduo seco incubado.

TABELA XXII - Influência da umidade do bagaço de cana, após a hidrólise a 0,5 atmosferas durante 2 horas e 30 minutos com  $H_3PO_4$  0,5% v/v, na sacarificação enzimática.

Pré-tratamento	Secagem 140°C	Extração $CHCl_3$	Horas de celulólise			
			12	20	36	60
Hidrólise fosfórica	-	-	24,13	26,81	29,13	30,45
Hidrólise fosfórica	+	-	7,90	9,57	10,37	10,61
Hidrólise fosfórica	+	+	17,64	20,61	22,71	24,41

Experiência realizada como descrito no item 2.6.2. de Materiais e Métodos.

TABELA XXIII - Inibição da sacarificação enzimática pelo carboidrato redutor liberado

Resíduo	Incubação por 60 horas	1ª Reincubação por 96 horas	2ª reincubação por 96 horas	Total
Bagaço de cana úmido	30,45	13,09	5,51	49,09
Bagaço de cana seco/extraído	24,41	9,22	5,48	39,11

Experiência realizada como descrito no item 2.6.3. de Materiais e Métodos.

Os valores da celulólise estão expressos em termos de g CR liberados / 100g peso seco da lignocelulose incubada.

ir que a dessecação do bagaço residual após a hidrólise fosfórica afeta sensivelmente a eficiência da celulólise.

A sacarificação enzimática do resíduo lignocelulósico, com o grau de umidade que é obtido na filtração que segue a hidrólise fosfórica (entre 75 e 85%) fornece uma concentração de CR de 30,45g% ao final de 60 horas de celulólise.

Quando este resíduo é dessecado a 140°C previamente à sacarificação enzimática, a concentração de CR liberados diminui em 65,15%. No entanto, o tratamento deste resíduo dessecado com clorofórmio, provoca um novo aumento na digestibilidade, obtendo-se uma concentração de CR de 24,41g%, valor inferior àquela obtida para o hidrolisado úmido.

### 22.3. Inibição da sacarificação enzimática pelo açúcar liberado.

Após ter sido feita a constatação na tabela XXII, de que aumentando o tempo de celulólise de 36 para 60 horas, praticamente não há aumento na concentração de CR liberados, tentou-se avaliar o efeito destes açúcares liberados sobre a sacarificação, mediante a reincubação por 2 vezes do bagaço residual, com nova e igual quantidade de enzima fresca, nas mesmas condições observadas para o primeiro ciclo de sacarificação enzimática.

Os dados da tabela XXIII demonstram que dos 49,09g% de açúcares redutores liberados durante 3 sacarificações sucessivas de resíduo úmido, num total de 252 horas, 62,02% são hidrolisadas nas primeiras 60 horas; 26,66% na primeira reincubação durante 96 horas e ainda 11,22% na segunda reincubação durante 96 horas.

Perfil semelhante é obtido para a celulólise do resíduo do experimento anterior, previamente dessecado a 140°C seguido de extração com clorofórmio. Dos 39,11g% de CR liberados ao final da experiência, 62,41% foram hidrolisadas nas primeiras 60 horas de incubação; 23,57% nas 96 horas da primeira reincubação e 14,01% nas 96 horas da última etapa de sacarifi

cação.

#### 22.4. Sacarificação enzimática de bagaço de cana e de sorgo, solvolisados, hidrolisados ou solvolisados e hidrolisados.

Dos dados constantes da tabela XXIV pode-se concluir que a celulólise é crescentemente melhorada na seguinte ordem: bagaço solvolisado < bagaço hidrolisado < bagaço solvolisado e hidrolisado.

Para o bagaço de cana residual após a solvólise e hidrólise fosfórica, obteve-se uma liberação de CR de 41,5g% após 90 horas de sacarificação enzimática, valor ligeiramente maior do que aquele verificado para o bagaço apenas hidrolisado.

Para o sorgo obteve-se um perfil semelhante, ou seja, quando a solvólise precede a hidrólise fosfórica, obtém-se um resíduo do qual se consegue libertar durante a sacarificação enzimática, um teor de CR 1,15 vezes àqueles obtidos para o bagaço hidrolisado.

#### 22.5. Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos obtidos na hidrólise de bagaço de cana em câmara de combustão de Parr.

A influência de parâmetros cinéticos da hidrólise ácida, como temperatura e concentração de  $H_3PO_4$ , na posterior sacarificação do resíduo lignocelulósico de bagaço de cana pode ser constatada na tabela XXV.

Com uma concentração fixa de  $H_3PO_4$  de 0,0625% v/v e temperaturas variáveis de 170, 185 e 200°C, obtiveram-se ao final de 62 horas, valores para a celulólise de 40,73g%, 61,87 g% e 74,07g% respectivamente.

Quando a temperatura é mantida em 170°C e a concentração de  $H_3PO_4$  gradualmente aumentada de 0,125 a 1,0% v/v, ob

TABELA XXIV - Sacarificação enzimática de bagaços de cana e de sorgo, solvolisados, hidrolisados e solvolisados/hidrolisados.

Resíduo	Pré-tratamento	Horas de celulólise			
		24	48	72	96
Cana	Solvólise	16,97	18,51	18,91	19,18
Cana	Hidrólise	33,23	36,85	39,19	39,87
Cana	Solvólise e Hidrólise	33,68	38,19	40,05	41,58
Sorgo	Solvólise	21,03	22,85	24,93	25,27
Sorgo	Hidrólise	29,72	30,54	35,06	34,99
Sorgo	Solvólise e Hidrólise	32,61	37,17	38,84	40,18

Experiência realizada como descrito no item 2.6.4. de Materiais e Métodos, e os valores da celulólise estão expressos em termos de g CR liberados / 100 g peso seco da lignocelulose incubada.

TABELA XXV - Sacarificação enzimática de bagaço de cana residual após hidrólise fosfórica em câmara de combustão de Parr.

Pré-tratamento	T (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> % v/v	Horas de celulólise		
			20	38	62
-	-	-	16,57	19,56	23,91
Solvólise	170	-	25,44	27,29	29,15
Hidrólise	170	0,0625	35,46	40,04	40,73
Hidrólise	170	0,125	44,96	46,00	54,60
Hidrólise	170	0,250	48,00	55,46	56,21
Hidrólise	170	0,500	65,89	71,91	72,97
Hidrólise	170	0,750	54,82	61,05	65,95
Hidrólise	170	1,000	54,57	57,51	60,99
Hidrólise	185	0,0625	54,14	60,55	61,87
Hidrólise	200	0,0625	63,88	73,27	74,07
Hidrólise	139	0,500	40,00	48,90	51,30

Experiência realizada como descrito no item 2.6.5. de Materiais e Métodos, e os valores da celulólise estão expressos em termos de g CR liberados / 100g peso seco da lignocelulose incubada.

tiveram-se taxas de sacarificação crescentes até a concentração de 0,5% v/v de  $H_3PO_4$ , a partir da qual o rendimento da celulólise volta a diminuir.

Para o resíduo hidrolisado na etapa química com 0,5% de  $H_3PO_4$ , obteve-se um rendimento na celulólise 2,5 vezes maior do que aquele verificado para o bagaço solvolisado na mesma temperatura.

Comparando-se a hidrólise com  $H_3PO_4$  a 0,5% em temperaturas de 170°C e 139°C (2,5 atmosferas) verifica-se que a primeira produz um resíduo lignocelulósico, que quando sacariificado com a celulase, libera 72,97g% de CR, em contrapartida aos 51,30g% obtidos a partir da celulólise do segundo.

A qualificação dos açúcares liberados durante a sacarificação enzimática através de cromatografia em papel, revelou a existência de D-glucose nas amostras previamente hidrolisadas com  $H_3PO_4$  a 0,0625% v/v e temperaturas de 185 e 200 °C ou temperatura de 170°C e concentrações de  $H_3PO_4$  de 0,50 , 0,75 e 1,0% v/v. Para as demais, somaram-se a esta hexose, traços de D-xilose.



## DISCUSSÃO

A obtenção de combustíveis líquidos, como o etanol, a partir de resíduos celulósicos, tem como etapa crítica a conversão da celulose a D-glucose, através da hidrólise enzimática.

Para suplantar os efeitos oriundos da própria barreira física que a lignina constitui, da cristalinidade da celulose, bem como da sua interação com a lignina, responsáveis diretos pela não digestibilidade dos materiais celulósicos, inúmeros pré-tratamentos (físicos, químicos, físico-químicos e biológicos) estão descritos na literatura.

No entanto o aproveitamento racional de biomassas secundárias (bagaço de cana e serragem de coníferas, entre outras) requer o emprego de um pré-tratamento, que propicie além da utilização posterior da celulose, o processamento eficiente da fração hemicelulósica, por constituir de 24 - 40% das madeiras duras e de 25 - 35% das madeiras moles (61,147).

Com esta finalidade, empregamos com sucesso o  $H_3PO_4$  diluído (0,0625 - 1,25% v/v) em temperaturas variáveis entre 121 e 200°C, para hidrolisar seletivamente a fração de pentosanas de Angiospermas (cana, sorgo, bracatinga) e Gimnospermas (Pinus).

Este pré-tratamento, a exemplo de outros ácidos, hidrolisa eficientemente as ligações glicosídicas da fração hemicelulósica, bem como deve afetar as ligações e interações lignina-hemicelulose, lignina-celulose e talvez as ligações entre as moléculas de lignina (66), provocando uma solubilização dos açúcares hemicelulósicos e um aumento da digestibilidade das fibras de celulose pelas celulasas (figura 12 e tabela XV).

Para facilitar a manipulação de fases (resíduo e filtração), e tendo-se em conta o inchamento dependente da umidade inicial dos bagaços (10% de água, em média, nas partidas processadas) fixou-se a relação catalisador : biomassa em 10 : 1; 8 : 1 ou 5 : 1 (v/p), uma vez que o simples encharcamento do material celulósico pela solução ácida diluída ( 5 : 1) produz rendimentos de CR, após a hidrólise fosfórica, semelhantes àqueles em que o catalisador foi utilizado numa relação 10 : 1 (tabela I).

No que diz respeito à relação catalisador : biomassa , sob o enfoque económico, é desejável que a relação seja a numericamente mais baixa possível, por reduzir o volume operacional, por proporcionar economia de catalisador e maior concentração de açúcares livres já no hidrolisado original.

Segundo GROHMAN e colaboradores ( 66 ) o aumento da relação de sólidos de 10 para 40%, além de propiciar economia de vapor, não diminui a eficiência do processo de hidrólise sulfúrica de palha de trigo, pois os açúcares em todos os casos, são produzidos na sua forma monomérica e a concentração de oligômeros de D-xilose não aumenta com o aumento da concentração de sólidos.

O ácido fosfórico diluído se mostrou um eficiente agente hidrolítico na depolimerização da fração de pentosanas de bagaço de cana e de sorgo, aproximando-se ao nível de hidrólise daqueles logrados com os ácidos clássicos: clorídrico e sulfúrico (tabela II). O pequeno aumento na liberação de CR observado na hidrólise clorídrica e sulfúrica, torna-se ainda mais insignificante quando se analisa as quantidades de furfural formadas durante as mesmas (figura 8).

Assumindo que a hidrólise sulfúrica gera 100% de furfural, a quantidade formada durante a hidrólise clorídrica é de 60% e durante a hidrólise fosfórica, apenas 40% daquela.

Este fato tem importância no processo fermentativo posterior, uma vez que concentrações de furfural entre 0,25 - 0,30 são letais para a levedura Pachysolen tannophilus ( 42 ), enquanto que concentrações de 0,11 e 0,074% respectivamente, provocam uma inibição de 25% na propagação e na fermentação da le-

vedura Saccharomyces cerevisiae (68 ).

A seletividade da hidrólise fosfórica, além da própria eficiência da hidrólise (tabela III) é claramente aparente e reconfirmável pela ausência de D-glucose (a partir de celulose) , nas análises cromatográficas em papel.

As xilanas de madeiras duras contém 3 - 5% de seu peso, em grupamentos O-acetílicos (82 ,147). Estes são liberados durante a solvólise ou auto-hidrólise de resíduos celulósicos e o ácido acético formado, provoca o abaixamento do pH da suspensão para 4,0 (tabela II) no qual ocorre a hidrólise das unidades de L-arabinofuranose ( 19 ) que constituem pequenas cadeias laterais nas xilanas de Angiospermas monocotiledôneas (gramíneas) ( 5 ).

Como a levedura Pachysolen tannophilus, a ser empregada no processo fermentativo subsequente, forma teores de etanol muito baixos a partir da L-arabinose, quando comparados àqueles obtidos a partir da D-xilose e D-glucose ( 35 ), a solvólise prévia do material propicia a remoção seletiva desta pentose ( figura 9), que segundo CHIANG e colaboradores ( 25 ) poderá ser utilizada para o crescimento de microrganismos produtores de xilose-isomerase com vistas à fermentação indireta de pentoses.

O componente majoritariamente liberado é a D-xilose (figura 9) quando esta solvólise é substituída por uma hidrólise fosfórica direta, pois nas Angiospermas a hemicelulose presente é predominantemente uma O-acetil-(4-O-metil-glucurono) xilana ( 5 ).

Quando se escalona o processo em duas etapas ou seja, solvólise seguida de hidrólise fosfórica do resíduo da primeira etapa auto-hidrolítica, recupera-se efetivamente um hidrolisado fosfórico mais enriquecido em D-xilose (figura 9).

Na etapa preliminar de estabelecimento da tecnologia fosfórica, ao uso do único equipamento então disponível (autoclave comercial para laboratório), na avaliação de parâmetros cinéticos da hidrólise, o emprego de pressões de 2,5 atmosferas (139°C) com concentrações de ácido variáveis de 0,25 - 1,25% v/v, associado a diversos tempos de residência (figura 10), mostra que os valores máximos observáveis na escala de ordenadas para a liberação de CR, coincide com o teor total (teórico) de

hemiceluloses de bagaço inteiro, ou seja, aproximadamente 26% para a cana (141) e 24% para o sorgo (31).

Perfil idêntico foi obtido quando se fixou o tempo de residência em 1 hora, variando-se a concentração do agente hidrolítico e a pressão de hidrólise (1,0 - 2,5 atm) (figura 11).

A análise das curvas de CR e CT, mostra que uma apreciável parte do conteúdo total de açúcares é liberado na sua forma oligomérica, quando o tempo de hidrólise é de apenas 30 minutos (figura 10) ou quando a pressão empregada é de apenas 1 atm (figura 11).

Quando o tempo de hidrólise é aumentado para 120 minutos ou a pressão para 2,5 atm, consegue-se a quase coincidência das curvas, indicando que os açúcares liberados estão na sua forma mais simples ou monomérica. Esta assertiva foi comprovada pela análise cromatográfica em papel dos produtos dos distintos ensaios cinéticos.

Observação semelhante foi feita por GROHMAN e colaboradores (67), que obtiveram durante a hidrólise sulfúrica de palha de trigo, em temperaturas de 95 - 120°C, a produção de oligossacarídeos, ao passo que o aumento desta temperatura para 140 - 160°C, provocou um aumento drástico na velocidade da reação, quando a mesma xilana foi totalmente hidrolisada a seus componentes monoméricos.

Confrontando os dados globais das figuras 10 e 11, e tendo-se em conta a economia de catalisador como objetivo básico, obviamente o emprego combinado de pressões consideradas industrialmente baixas ou médias (2,0 - 2,5 atm) e tempos de residência aceitáveis (30 - 60 minutos), pode-se lograr completa hidrólise das hemiceluloses com o emprego de concentrações muito diluídas de  $H_3PO_4$ , ou seja 0,25 - 0,75% v/v.

A total liberação da fração hemicelulósica de cana, pode ser igualmente conseguida pelo emprego de uma concentração de  $H_3PO_4$  de 0,125 - 0,25% v/v, desde que se fixe o tempo de hidrólise em 1 hora, mas se eleve a temperatura para 170°C (figura 12) ou pelo uso de uma concentração ainda menor de ácido (0,0625% v/v), mas a temperatura é elevada para 185°C (figura 13).

Estes resultados são relevantes em função de envolverem operações industriais de rotina (vapor, vapor super aquecido , reatores cerrados, etc) e de permitirem uma significativa redução na concentração de ácido fosfórico empregado, mais econômica e próxima do mínimo requerido por microrganismos planejados para as etapas fermentativas.

Este baixo nível de ácido utilizado é a condição preferencial de reação, por melhorar a seletividade da hidrólise das pentosanas e pela diminuição da produção de D-glucose a partir da celulose ( 91 ).

Como a digestibilidade enzimática da celulose parece estar intimamente relacionada à remoção das xilanas, GROHMAN e colaboradores ( 67 ), também preconizaram o uso de pré-tratamentos a temperaturas mais elevadas, por apresentarem a vantagem adicional, de requerer menores tempos de reação.

Segundo DEKKER ( 34 ), as hemiceluloses A e B de bagaço de cana, são compostas respectivamente por: 97% de D-xilose + 3% de L-arabinose e 62% de D-xilose + 6% de L-arabinose + 1% de D-rhamnose + 32% de D-glucose. É contudo, a hemicelulose A dominante. Em nenhuma das condições empregadas durante a hidrólise fosfórica de cana (ex: figura 12), foi constatada a presença da D-glucose, que pode derivar, segundo o autor, de uma  $\beta$ -D-glucana não celulósica, coextraída com a hemicelulose B durante o processo.

A mesma metodologia até aqui descrita para as Angiospermas monocotiledôneas (cana e sorgo), pode ser aplicada às Angiospermas dicotiledôneas (bracatinga) e às hemiceluloses de Gimnospermas (Pinus).

A solvólise de serragem de troncos de Pinus taeda, provoca a solubilização dos polissacarídeos, dos quais apenas 29,4% são hidrolisados a seus componentes monoméricos (figura 14). Estes, são representados pela L-arabinose (figura 17) originária de arabinogalactanos, que são os únicos polissacarídeos solúveis em água, cujo teor em coníferas varia entre 1,0-25% ( 146 ).

Os resultados da ação do ácido fosfórico neste tipo de

hemiceluloses, é também significativo, como é visível nas figuras 15 e 16.

O perfil de monossacarádeos do cromatograma de acetatos de alditóis da figura 18 é compatível com a composição hemicelulósica de Gimnospermas e a ordem quantitativa é a seguinte: D-manose > D-xilose > D-galactose > D-glucose > L-arabinose, confirmando que 50% do total das hemiceluloses de coníferas é representada pelas glucomananas, que chegam a representar 11% do seu peso seco ( 5 , 82 ).

Para as coníferas, a relação man/glc é variável de 2,5 - 3,0 (146), sendo que para o caso específico do Pinus taeda , esta relação é de 2,7 (148). Os dados da tabela XVIII atestam a aplicabilidade da hidrólise fosfórica também a modelos de biomassa residual gimnospérmica, pois a relação alí obtida é de 2,7 e portanto satisfatória para a hemicelulose majoritária de Pinus.

A hemicelulose A de Mimosa scabrella também pode ser hidrolisada pelo emprego do ácido fosfórico (figuras 15 e 16), dando origem, principalmente a D-xilose (figura 18) confirmando tratar-se igualmente de uma glucuronoxilana, tal como as hemiceluloses das demais Angiospermas usadas.

Esta aplicação a um modelo angiospérmico de leguminosas é significativa em vista da sua importância econômica na atividade florestal paranaense. Ademais, a hemicelulose A de bratinga (fração majoritária) é o modelo de heteroxilana mais profundamente estudado no País, em função dos trabalhos acumulados sobre sua estrutura fina ( 27 , 28 , 121 ).

Sabendo-se que a hidrólise ácida não remove quantidades significativas de lignina do substrato, mas apenas catalisa a sua modificação química, através de reação de hidrólise/repolimerização ( 67 ), verificou-se entretanto que a delignificação prévia do material promove um aumento no rendimento da hidrólise fosfórica de bagaços de cana e de sorgo (tabela V).

Quando a cloro-lignina formada não é extraída antes da hidrólise ácida, provoca uma diminuição no pH da suspensão, com consequente aumento no rendimento do processo hidrolítico. A ex

tração da cloro-lignina com etanolamina e etanol, diminui o rendimento da hidrólise fosfórica, por extrair parte da hemicelulose (ligada à lignina) devido ao pH alcalino da lignina.

Esta clorodelignificação, obviamente, favorece sobremaneira a celulólise do resíduo (tabela XXI).

O furfural formado durante a hidrólise fosfórica de bagaço de cana ( $H_3PO_4$  0,125% v/v; 10 atm), numa concentração de 0,111% v/v (tabela VI), pode ser extraído eficientemente do hidrolizado neutralizado a pH 4,0 através do uso de clorofórmio e carvão ativo. O clorofórmio diminui o teor de furfural em 41,45% enquanto que o tratamento do hidrolisado com carvão ativo, provocou uma diminuição no teor de furfural de 45,04%.

Segundo DEKKER (37), compostos fenólicos (vanilina, siringialdeído, ácido benzóico e derivados do aldeído benzóico) formados durante a pré-tratamento ácido de materiais lignocelulósicos, podem ser extraídos pelo emprego de acetato de etila, com a vantagem de poder ser recuperado por destilação, além do que os açúcares tem pequena solubilização neste solvente.

No entanto, o tratamento com o acetato de etila, foi o menos eficiente entre os ensaiados, uma vez que extraiu apenas 17,11% do furfural inicialmente presente (tabela VI).

O mesmo efeito verificado quando da extração do hidrolisado com clorofórmio, é observado quando o hidrolisado é concentrado até xarope por 2 vezes em rotavapor a 80°C (92,109).

Priorizada a abordagem da etapa tecnológica química, a etapa biotecnológica posterior concentrou-se no aproveitamento dos hidrolisados fosfóricos com vistas à obtenção de etanol, através do emprego de leveduras do gênero Pachysolen, Candida, Pichia e o fungo do gênero Fusarium.

O emprego da levedura Pachysolen na avaliação da possibilidade fermentativa da pentose de hidrolisados fosfóricos até etanol e biomassa microbiana foi pioneira no País (51), ressalvadas as restrições operacionais como catabolização do etanol formado, eficiência reduzida pela osmolaridade do substrato e efeito inibitório de fenólicos, que se constatarem logo após a primeira documentação bibliográfica do uso desta levedu-

ra selvagem para a bioconversão de pentoses, em 1981 (134).

Além de proporcionar a despolimerização seletiva da fração de pentosanas de Angiospermas e Gimnospermas, outra vantagem do uso do  $H_3PO_4$  diluído, é o fato de não apresentar ação tóxica ou inibitória no processo fermentativo posterior.

O ânion fosfato, quando presente em concentrações crescentes em soluções de D-xilose submetidas à fermentação com o fungo Fusarium oxysporum, além de não apresentar efeito inibitório sobre o crescimento micelial e produção de álcool, provoca um estímulo destes parâmetros até uma concentração de 0,75% (tabela VIII).

Igualmente, os íons fosfato estimulam o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus numa concentração de até 0,50% ao passo que a produção de etanol é máxima com 0,25% de ácido fosfórico (tabela VII).

Vale recordar que para os dois ácidos clássicos para a hidrólise de lignoceluloses, o HCl e o  $H_2SO_4$ , é indispensável a eliminação pós-catálise, respectivamente por destilação e precipitação com cal.

Segundo KURTZMAN (88), a natureza mucóide das culturas de Pachysolen tannophilus demonstra a presença de polissacarídeo extracelular, representado principalmente por O-fosfomananos, cujo teor depende do conteúdo de ortofosfato no meio. Esta constatação pode também ser feita na tabela VII, onde se verifica que uma concentração de  $H_3PO_4$  de 2,0% produz 60,79% de polissacarídeos a mais do que aquela produzida pelo controle (sem fosfato).

Alguma medida isolada sobre o consumo significativo de íons fosfato, mostrou que este consumo foi menor do que 10% do inicialmente presente.

Com isto se confirma uma das vantagens que postulamos para o emprego do ácido fosfórico na hidrólise de biomassas, visando a utilização do hidrolisado como fonte de C e P para a obtenção de álcool etílico e/ou biomassa microbiana.

Em vários países está estabelecida a tecnologia de produção de biomassa ou proteína microbiana (SCP) a partir de car



bohidratos ou parafinas ( 95 ), com vistas à alimentação animal. Esta é a possibilidade que se afigura como mais imediata para os hidrolisados fosfóricos, restando-se executar a avaliação do conteúdo e qualidade proteica da biomassa microbiana de Pachysolen tannophilus, Candida shehatae e Pichia stipitis.

Efeitos estimulantes com os íons fosfato, também foram observados por HAJNY ( 68 ), ao comprovar que 0,056g% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  adicionados ao meio de cultivo, além de aumentar o rendimento da fermentação alcoólica por Saccharomyces cerevisiae, diminuem o teor do subproduto, o glicerol.

No entanto, segundo BECK ( 14 ), a combinação de KCl e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  produz uma fonte de fosfato melhor que o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

O  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , previamente à fermentação, deverá ser parcialmente neutralizado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Nesta etapa haverá a formação de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , que além de fornecer fosfato ao meio, atua também como fonte de N. Esta foi a rotina adotada, visto contemplar a formulação básica clássica de meios fermentativos: C, N e P.

O uso do  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  também foi preconizado por DEL ROSARIO ( 40 ) como fonte de P e N em melaço de cana de açúcar a ser fermentado com a levedura Saccharomyces cerevisiae.

JEFFRIES ( 79 ) demonstra que a fonte de N empregada, afeta a mudança do pH do meio, durante a fermentação com a levedura Candida shehatae. Mesmo quando o meio é tamponado, o pH se eleva 0,7 de unidade em culturas acrescidas de uréia e cai 0,3 de unidade em cultivos contendo o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte única de N, ao passo que culturas com P, mantém o seu pH constante.

Igualmente, a fonte de N usada afeta a produção de etanol, sendo que a uréia e os fosfatos são melhores fontes de N que o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( 79 ).

A estimulação na produção de etanol observada pela combinação da uréia e P, pode ser atribuída ao efeito do  $\text{NH}_4^+$  no ciclo de Embden-Meyerhof, já que o  $\text{NH}_4^+$  estimula a fosfofrutoquinase em Saccharomyces cerevisiae ( 82 ), podendo ocorrer efeito semelhante aqui.

A levedura inicialmente usada para a bioconversão dos hidrolisados fosfóricos, foi a fermentadora de pentoses, Pachy

solen tannophilus, recentemente descrita (134).

Ainda que valores diversos de pH, ótimos para o crescimento e produção de etanol por esta levedura, estejam descritos na literatura: pH 2,5 determinado por SLININGER (138); pH entre 2,5-2,75 por DEKKER (35); pH 3,5 por DEVERELL (43); pH 4,5 por BECK (14) e pH 4,8 por DEBUS (33), verificou-se que o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus apresentou multiplicação máxima em pH 5,0 ao passo que a formação de etanol foi máxima em pH 4,0 (tabela IX).

Pelos valores expostos, conclui-se que o pH ótimo para o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus é ligeiramente maior do que aquele requerido para a produção máxima de etanol (figura 19).

Igualmente para a levedura Candida shehatae estão relatados valores de pH ótimos de 3,2-3,4 (79); 4,5-5,5 (14) e 5,0 (161). No entanto a tabela XI demonstra que o melhor crescimento desta levedura foi obtido em pH 3,5 ao passo que a produção de etanol é semelhante em pH 4,5 e 5,5. O mesmo, foi verificado por BECK (14), que faz a ressalva de que em pH 5,5 a levedura em questão tolera melhor o furfural presente em hidrolisados.

Para JEFFRIES (79) a produção de etanol por Candida shehatae diminui quando o pH é aumentado de 2,6 para 5,3, além do que a produção de xilitol é aumentada quando se eleva o pH de 2,6 a 3,3.

O pH ótimo de crescimento determinado para o fungo Fusarium oxysporum foi de 3,5 (tabela X), com mínimas variações quando este era de 3,0 ou 4,0.

A adição de íons cloreto a 0,05g% ao meio de fermentação, ocasiona uma diminuição no crescimento da levedura Pachysolen tannophilus (tabela XII).

Assim se confirma que o P quando neutralizado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  constitui uma fonte de N mais eficiente do que o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (79), justificando a necessidade da eliminação dos íons cloreto presentes, no caso de uma hidrólise clorídrica.

Ainda que concentrações de sulfato de até 0,05g% esti-

mulem o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus (tabela XII), deve-se levar em consideração que este ânion, quando usado como agente hidrolítico na depolimerização da fração hemice-lulósica, produz grandes quantidades de furfural (figura 8).

Perfil semelhante, no que diz respeito aos íons cloreto e sulfato, foi obtido para o fungo Fusarium oxysporum (tabela XIII).

A eficiência da conversão da D-xilose a etanol é aumentada pelo extrato de levedura (14) e pode ser verificada na tabela XIV.

A levedura Pachysolen tannophilus requer vitaminas (tiamina e biotina) (39,105), por isso, a adição de extrato de levedura ao meio constituído de hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana, provoca um grande aumento no crescimento celular obtido.

Este extrato de levedura, incorporado ao meio de fermentação, constitui não somente fonte extra de C e N, mas também supre o mesmo dos fatores de crescimento (21).

Quando se incorpora ao meio o extrato de levedura e a uréia, há um crescimento ligeiramente menor do que aquele observado para o meio onde a única fonte de N era o extrato de levedura (tabela XIV). Observação idêntica foi feita com a levedura Candida shehatae, quando BECK (14) associou o mesmo extrato de levedura e a uréia.

No entanto, quando este hidrolisado de cana não sofreu nenhum tratamento, visando a eliminação de substâncias tóxicas formadas durante a depolimerização fosfórica, não ocorreu formação de etanol em quantidades significativas pela levedura Pachysolen tannophilus (tabela XIV-D).

Uma produção de etanol sub-ótima foi encontrada também para a levedura Pachysolen tannophilus, em hidrolisados ácidos de palha de trigo, sem prévio tratamento (41).

Uma cepa de levedura, a Candida sp B-22 foi adaptada à hidrolisados sulfúricos de bagaço de cana não tratados. Neste, quando apenas, neutralizado, houve a produção de xilitol em teores equivalentes a 85% do valor teórico (24).

O mesmo hidrolisado fosfórico de bagaço de cana, quando 2 vezes concentrado, não promove o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus, nem mesmo a produção de etanol (tabela XIV).

Disto se conclui que durante a hidrólise fosfórica, se formam além do furfural, outras substâncias igualmente inibidoras para a levedura, pois 41,45% do furfural presente é eliminado pela concentração em rotavapor (tabela VI).

Quando a concentração é acompanhada de extração com clorofórmio, paralelamente ao crescimento celular, há a formação de etanol, em quantidade equivalente a 88,23% do rendimento teórico.

Durante a concentração dos hidrolisados, além da diminuição do teor de furfural, deve haver a concentração de outras substâncias, cuja ação tóxica não é suplantada pelo emprego do extrato de levedura (tabela XIV).

Quando o mesmo hidrolisado suplementado com extrato de levedura foi submetido à fermentação com o fungo Fusarium oxysporum, obteve-se etanol após 165 horas de fermentação, em concentrações de 0,23g%. SUIHKO e ENARI (145) obtiveram produção máxima de etanol e CO<sub>2</sub>, a partir de D-xilose com o mesmo fungo, após 144 horas de fermentação. Este longo período requerido pelo fungo, para a conversão de hidrolisados fosfóricos a etanol, se deve à presença de inibidores nos mesmos, aos quais o fungo é particularmente sensível (82,152)

O mesmo efeito estimulante do extrato de levedura no crescimento da levedura Pachysolen tannophilus, pode ser observado quando o mesmo é acrescentado em concentrações variáveis a hidrolisados fosfóricos de serragem de Pinus (tabela XV).

Quando concentrações variáveis de extrato de levedura, entre 0 - 1g% foram incorporadas por BECK (14) a hidrolisados ácidos de madeiras, houve um aumento na produção de etanol pela levedura Candida shehatae de 0,34g/g D-xilose consumida para 0,39g/g.

A idade do inóculo de Pachysolen tannophilus tem influência direta no processo fermentativo de hidrolisados de Pinus (tabela XVI).

Ainda que o crescimento celular é diretamente proporcional à idade do inóculo utilizado, o máximo rendimento de etanol (=66,53% do teórico) é conseguido após 72 horas de fermentação, com o inóculo de 24 horas. A utilização de culturas mais velhas como inóculo (72 e 96 horas) antecipa o pico da produção de etanol em 17 horas, porém os rendimentos são ligeiramente menores (44,70 e 49,80% do teórico, respectivamente), além do que acelera tremendamente o consumo deste etanol formado.

Segundo MALESZKA e SCHNEIDER (101), o xilitol é encontrado nos meios de fermentação de pentoses, em concentrações que podem exceder 15% do açúcar originalmente presente.

Nos meios de fermentação de hidrolisados fosfóricos não foi detectada a presença de xilitol, como sub-produto. Isto é mais uma vantagem da tecnologia fosfórica proposta, uma vez que a levedura Pachysolen tannophilus não é capaz de reassimilar o xilitol, para usá-lo como fonte de C (135). Para isto, contribui o próprio fosfato, uma vez que JEFFRIES (79) já constatou que o P (adicionado exógenamente) não somente não ocasiona melhores rendimentos de etanol, como também suprime a formação de xilitol.

A pressão empregada durante a hidrólise fosfórica de serapagem de Pinus, tem influência direta sobre o rendimento da fermentação etanólica com a levedura Pachysolen tannophilus (tabela XVII).

A suplementação destes hidrolisados (2 e 6 atm) com 0,15g% de extrato de levedura, conduz à formação de etanol em concentrações de 0,205 e 0,315g/g D-xilose consumida, equivalentes, respectivamente, a 40,19 e 61,76% do rendimento teórico.

Esta melhora significativa nos rendimentos da fermentação, obtida com os hidrolisados a 6 atm, pode ser atribuída à variação na composição dos açúcares do hidrolisado (tabela XVIII)

Nos dois casos, confirma-se mais uma vez que entre as hemiceluloses de coníferas, as glucomananos representam a maior parte (37,2% dos açúcares presentes no hidrolisado obtido a 6 atm e 41,25% para o obtido a 2 atm).

A tabela XVIII mostra que a nível da liberação das pentoses é que a diferença se torna mais significativa. Durante a hidrólise a 2 atm, há uma maior liberação de L-arabinose, oriunda de arabinogalactanos, cuja proporção em coníferas pode atingir 25% (146).

Como a levedura Pachysolen tannophilus, forma a partir desta pentoses, teores muito pequenos de etanol (35), atribui-se os menores rendimentos observados com o hidrolisado a 2 atm, à presença desta pentose.

A adição de peptona como fonte de N, conduziu a rendimentos etanólicos inferiores àqueles obtidos com o extrato de levedura, em ambos os hidrolisados.

Durante a fermentação de hidrolisados fosfóricos de serapagem de Pinus, verificou-se que ocorre inicialmente o consumo da D-glucose e D-manose, seguida pela D-galactose e finalmente das duas pentoses (figura 21).

Este perfil de consumo de açúcares, está de acordo com DETROY (42) segundo o qual as células utilizam preferencialmente os açúcares com 6 átomos de C (D-glucose e D-manose) antes de metabolizar os C-5 açúcares, como a D-xilose e a L-arabinose.

A fermentação de pentoses, também pode ser realizada, entre outras, pelas leveduras Candida shehatae (44, 79) e Pichia stipitis (39).

Segundo JEFFRIES (81), a levedura Pichia stipitis é o estágio sexual perfeito da levedura Candida shehatae, sendo ambas melhores produtoras de etanol que a Pachysolen tannophilus.

A levedura Candida shehatae, ao contrário da Pachysolen tannophilus, forma quantidades de etanol equivalentes a partir de D-xilose e D-glucose (81).

Por sua vez, a Pichia stipitis apresenta como vantagem as melhores taxas de conversão, a menor produção de xilitol, não tem necessidade dos fatores de crescimento e é capaz de fermentar a D-xilose sob condições estritamente anaeróbicas (39).

Esta maior eficiência da levedura Pichia stipitis na fermentação etanólica de pentoses, é atribuída ao fato que a

sua enzima xilose redutase, apresenta atividade tanto em presença de NADPH como de NADH ( 39 ).

Por sua vez, a enzima xilose redutase da levedura Pachysolen tannophilus tem como coenzima, exclusivamente o NADPH, portanto durante o metabolismo de oxidoredução das pentoses, ocorre acúmulo de NADH que bloqueia outras atividades metabólicas (figura 6).

Quando as leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, foram cultivadas em solução de D-xilose, obteve-se a confirmação dos maiores rendimentos apresentados pelas duas últimas (tabela XIX).

Os rendimentos etanólicos foram de 50,19% , 50% , 62,35% e 73,52% do rendimento teórico, obtidos respectivamente com as leveduras Pachysolen tannophilus, Pachysolen tannophilus 2, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6.

As duas leveduras, Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6, eficientes na conversão da D-xilose p.a. a etanol, mostraram-se inaptas em fermentar, excluídos de quaisquer tratamentos, os hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana e de serragem de Pinus, devido também aos compostos inibidores criados durante a hidrólise. Segundo BECK ( 14 ), a levedura Candida shehatae é particularmente sensível aos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados.

Com a levedura Pachysolen tannophilus, por nós empregada em todos os demais experimentos fermentativos, obteve-se um crescimento celular ligeiramente maior em Pinus, em relação àquele obtido na cana. Paralelamente, houve a produção de etanol, em quantidades equivalentes a 21,56 e 52,94% do teórico , respectivamente para a cana e o Pinus.

Estes rendimentos, são significativos, por tratar-se de hidrolisados fosfóricos não tratados, uma vez que a mesma levedura não produziu etanol, quando cultivada em hidrolisados ácidos de palha de trigo, sem prévio tratamento ( 42 ).

A outra cepa (mutante) da levedura do gênero Pachysolen, a Pachysolen tannophilus 2 apenas produziu quantidades significativas de etanol em hidrolisados de Pinus, com rendimentos

de 62,74% do teórico, valor superior àquele apresentado pela cepa rotineiramente utilizada.

Os maiores rendimentos etanólicos encontrados quando do aproveitamento de hidrolisados fosfóricos de Pinus, podem ser atribuídos à menor proporção de furfural formada durante a hidrólise ácida de coníferas. Em idênticas condições, durante a hidrólise de Pinus, se forma 55,4% a menos de furfural do que aquela formada a partir da cana.

Com a observação prévia de que o tratamento de hidrolisados fosfóricos com clorofórmio ou com carvão ativo, provoca uma redução significativa nos conteúdos de furfural dos mesmos (tabela VI), experiências posteriores foram conduzidas neste sentido com a intenção de melhorar os rendimentos até aqui obtidos.

O prévio tratamento de hidrolisados fosfóricos de bagaço de cana com clorofórmio ou carvão ativo, provoca uma melhoria nos rendimentos da fermentação alcoólica com as leveduras Pachysolen tannophilus e Pachysolen tannophilus 2 (tabela XX).

A levedura Pachysolen tannophilus formou em hidrolisados tratados com  $\text{CHCl}_3$  e carvão, etanol em níveis de, respectivamente, 1,25 e 2,0 vezes superiores àqueles formados no hidrolisado controle.

Perfil semelhante foi obtido com a levedura Pachysolen tannophilus 2. Como no caso da experiência anterior, não houve a produção de etanol a partir de hidrolisados fosfóricos sem tratamento, porém a extração dos mesmos com  $\text{CHCl}_3$  ou carvão ativo, produz rendimentos de 23,72% e 32,54% do teórico, respectivamente.

Como visto anteriormente, as leveduras Candida shehatae 1 e Pichia stipitis 6 não formam etanol a partir de hidrolisados fosfóricos sem tratamento, quer de Pinus, quer de cana. Porém quando este (hidrolisado de cana) é extraído com carvão ativo, há a formação de etanol em proporções apenas 4,4% e 31,20% respectivamente, inferiores àqueles obtidos em D-xilose p.a. (tabela XX).

O tratamento com  $\text{CHCl}_3$  foi menos eficiente para a levedura



dura Candida shehatae 1, mas a levedura Pichia stipitis 6 apresentou no hidrolisado assim tratado, uma longa lag-fase, ao final da qual houve a formação de etanol equivalente a 50,0% do teórico.

Ainda que as concentrações de furfural nos hidrolisados tratados sejam muito semelhantes, 0,053% v/v para o hidrolisado tratado com clorofórmio e 0,050% v/v para o tratado com carvão, os dados anteriores reforçam a co-existência nos hidrolisados, de produtos inibitórios, outros que o furfural, os quais são mais eficientemente extraídos pelo emprego do carvão ativo.

O consumo do próprio etanol formado pela levedura Pachy solen tannophilus citado por MALESZKA e SCHNEIDER (98) e pela levedura Candida shehatae constatado por DU PREEZ (44), foi aqui observado para as quatro leveduras empregadas.

Sabendo-se que uma concentração de 0,1% de D-glucose, inibe rapidamente o consumo de etanol (98), seria de se esperar que nos hidrolisados de coníferas, devido à presença da D-glucose, a metabolização fosse inibida ou pelo menos retardada. Na prática, isto não acontece, porque em misturas de açúcares, a D-glucose e a D-manose são utilizadas antes (figura 21), sendo portanto o consumo de etanol regulado pela D-xilose no final do processo. Uma possibilidade para explicar os efeitos destes açúcares no consumo do álcool pelas leveduras, é o efeito Crabtree (inibição da respiração das leveduras pelo aumento da concentração de substrato) ou a repressão da síntese da álcool desidrogenase, já que em Saccharomyces cerevisiae, a D-glucose reprime a ação de 2 das 3 desidrogenases (98).

Com a intenção de prevenir esta respiração do etanol, e portanto aumentar os rendimentos, BECK (13) preconiza a adição de D-glucose à fermentação de hidrolisados hemicelulósicos.

Em nosso trabalho, esta estratégia poderia ser contemplada, incorporando parte da D-glucose a ser gerada na etapa de celulólise enzimática a partir da lignocelulose residual fosfórica.

Uma outra grande vantagem da hidrólise fosfórica, é o fato de dar origem a um resíduo lignocelulósico altamente reati

vo frente às celulases.

Este resíduo lignocelulósico é constituído, no caso de bagaço de cana de 75% de celulose e 25% de lignina e para o sorgo de 73% de celulose e 27% de lignina (como avaliado pela hidrólise de Saeman e gravimetria da lignina residual ácido insolúvel).

O grau de polimerização da celulose que é da ordem de 10.000 (116) é diminuído para 100 - 200 pelo tratamento ácido clássico clorídrico ou sulfúrico (15).

A degradação enzimática desta celulose é um processo complexo que requer a participação de muitas enzimas. Segundo PETTERSON (15), o mecanismo proposto para a sua degradação é o seguinte:

- a) Regiões de baixa cristalinidade da celulose são atacadas por endoglucanases, criando novos terminais livres na cadeia celulósica.
- b) A partir destes terminais são removidos resíduos de celobiose, por ação das exoglucanases.
- c) A celobiose é hidrolisada a D-glucose, pela  $\beta$ -glucosidase.

Ainda que a hidrólise ácida diluída não provoque a diminuição do conteúdo de lignina do substrato (87), a delignificação do bagaço de cana e de sorgo, além de melhorar o rendimento da hidrólise fosfórica (tabela V) provoca um aumento na digestibilidade do resíduo lignocelulósico obtido (tabela XXI).

A extração da cloro-lignina previamente à hidrólise fosfórica de bagaço de cana, faculta uma recuperação, por ação das enzimas, de 37,33% do conteúdo de celulose presente no resíduo, ao passo que o valor correspondente para o resíduo não clorado submetido à mesma hidrólise, foi de 21,33%.

Para o sorgo, os referidos valores de recuperação da celulose, foram de 48,0% e 33,33%, respectivamente.

Segundo CHAHAL (20), a delignificação através da cloração da amostra é mais eficiente que os demais procedimentos adotados, porque nestes se removem paralelamente pentoses.

O resíduo celulósico resultante da hidrólise fosfórica

deverá ser sacarificado ainda úmido (tabela XXII).

Para tanto, estocagem adequada do material é necessária, por causa da sua natureza perecível, determinada pelo elevado teor de umidade.

Na impossibilidade de processamento imediato da lignocelulose residual, pode-se preservá-lo até a sacarificação pelo emprego de ácido propiônico a 2%, protegendo-o do ataque de fungos por até 18 meses (76).

A dessecação do resíduo lignocelulósico ao final da hi-drólise fosfórica, provoca a degradação enzimática de apenas 14,14% da celulose presente, em função de reordenamento (ou rein-teração) entre a lignina e a celulose, ao passo que a sacarificação do resíduo úmido (75 - 85% umidade) atinge valores de recuperação da celulose de 40,6%.

Esta inibição pode ser parcialmente revertida pela extração do resíduo dessecado com  $\text{CHCl}_3$ , quando há desdobramento de 32,54% da celulose presente.

Durante a sacarificação enzimática, a celulose é degradada a celobiose e D-glucose. Estes produtos de hidrólise formados, inibem a atividade da celulase, sendo que a celobiose é um inibidor mais potente que a D-glucose, e é especialmente ativa na inibição da hidrólise da celulose cristalina. A D-glucose inibe a celobiase, ocasionando o acúmulo da celobiose no meio da reação (58). As celulasas comerciais são ainda deficientes em  $\beta$ -glucosidase, resultando também no acúmulo do produto final inibidor, a celobiose (114).

Este problema poderia ser solucionado pela seleção de mutantes cujos complexos celulolíticos seriam resistentes à inibição pelos produtos finais (58) ou pela remoção dos açúcares li-berados e incubação do resíduo lavado com nova enzima (tabela XXIII). Após 36 horas de incubação com celulase, houve degrada-ção de 38,84% da celulose presente no resíduo lignocelulósico de bagaço de cana, previamente hidrolisado com ácido fosfórico. Quando este tempo de incubação é aumentado para 60 horas, houve um aumento insignificante da digestibilidade da celulose (40,62%)(ta-bela XXII). No entanto, quando o mesmo resíduo, lavado exaustiva

mente com água destilada para remoção completa dos açúcares inibidores, é reincubado com nova e igual quantidade de enzima, consegue-se hidrolisar mais 17,45% da celulose e num segundo ciclo de reincubação, ainda a quantidade adicional de 7,34% ( tabela XIII)

Quando a hidrólise de bagaço de cana e de sorgo é precedida de uma etapa de solvólise, além da remoção seletiva da L-arabinose na etapa química, há um ligeiro aumento da digestibilidade posterior do resíduo lignocelulósico (tabela XXIV). As condições de hidrólise empregadas, facultam uma degradação de 53,16 % da celulose remanescente do resíduo lignocelulósico de bagaço de cana, ao passo que se uma etapa de solvólise é incluída previamente à hidrólise fosfórica, esta degradação enzimática aumenta para 55,44%.

A celulose nos resíduos pré-tratados com  $H_3PO_4$  diluído é muito mais digerível que as fibras originais, em todas as condições testadas (tabela XXV). Na melhor condição de pré-tratamento (200°C;  $H_3PO_4$  0,0625% v/v) a celulose se torna completamente digerível (98,76%).

É interessante notar que a remoção da hemicelulose e a suscetibilidade enzimática da lignocelulose residual estão correlacionadas e diretamente influenciadas pelo aumento da temperatura durante o tratamento ácido.

Observação semelhante foi feita por KNAPPERT e colaboradores ( 87 ), ao hidrolisarem madeiras de álamo com  $H_2SO_4$  1,5% ; tempos de residência variáveis entre 3,6 e 12,7 segundos e temperaturas variáveis entre 162 e 222°C. Os maiores rendimentos na celulólise, foram obtidos quando o álamo foi pré-tratado em temperaturas que variavam entre 180-200°C.

GROHMAN e colaboradores (67 ) atribuem este sucesso do emprego de altas temperaturas, à parcial fusão e coagulação da lignina, que provoca a abertura de poros, os quais permitiriam a entrada de grandes moléculas de celulose durante a sacarificação enzimática.

Valores igualmente elevados na conversão da celulose (97,29%) podem ser conseguidos através da sacarificação enzimática

ca do resíduo obtido após a hidrólise fosfórica a 170°C e concentração de ácido de 0,5% v/v (tabela XXV).

Concentrações maiores de ácido provocam uma diminuição no rendimento da celulólise. Efeito como este (diminuição da digestibilidade) foi verificado por KNAPPERT e colaboradores, pelo emprego de temperaturas de 220°C durante a hidrólise ácida (87 ).

A despolimerização observada para o bagaço nativo e o bagaço solvolisado, é devido à hemicelulose presente, pois as enzimas cruas de Trichoderma sp também tem atividade hemicelulásica (91,121).

Como cerca de 50 - 90% da celulose está localizada na região cristalina da fibra (48 ), conclui-se que pelos valores de recuperação da celulose obtidos (tabela XXV) que o pré-tratamento fosfórico faculta a digestibilidade tanto da região amorfa como da sua região originalmente cristalina.

Como, segundo GARG e NEELAKANTAN (55 ), grande parte da celulose de bagaço de cana, está na forma de ligno-celulose, confirma-se também o fato de que a hidrólise ácida fosfórica deve romper as ligações lignina-celulose, como preconizado por outros autores (66 ).

Nestas condições (tabela XXV), a despolimerização da celulose é praticamente quantitativa, o que se confirma pela hidrólise trifluoracética do resíduo final, e consequente detecção de apenas traços de D-glucose.

Em resumo, os dados experimentais do pré-tratamento fosfórico e consequências favoráveis, justificam assumir esta tecnologia como inovadora (52 ) na temática de quimio e bioconversão de resíduos agrofloretais e passível de aprofundamento em etapas futuras.

## CONCLUSÕES

Com respeito ao emprego do ÁCIDO FOSFÓRICO DILUÍDO (0,0625 a 2,0% v/v), sob pressão e aquecimento (1 a 14 atmosferas = 121 a 200°C) para a desagregação do terno hemicelulose - lignina-celulose da arquitetura nativa de fitobiomassas e concomitante despolimerização seletiva da fração hemicelulósica para fins fermentativos, são os seguintes os dados experimentais mais significativos:

- 1) A relação bagaço : ácido diluído variável entre 1 : 6 até 1 : 10 leva a mesma recuperação em termos de açúcares redutores liberados a partir da fração hemicelulósica e portanto, operacionalmente, é satisfatório o encharcamento do material.
- 2) Comparativamente às hidrólises mais clássicas, como a clorídrica e sulfúrica (0,5% p/v), a hidrólise fosfórica, mantidos os parâmetros de pressão/temperatura e tempo de residência, propicia semelhante solubilização e hidrólise das heteroxilanas, com a vantagem adicional de menor co-produção de furfural, um sub-produto da degradação das pentoses liberadas.
- 3) A eficiência e seletividade da hidrólise fosfórica para a fração hemicelulósica foi verificada pelo perfil cromatográfico da composição de monossacarídeos dos hidrolisados: D-xilose » L-arabinose, no caso de serragem de bracatinga ou bagaços de cana e sorgo ou D-manose » D-xilose > D-galactose > D-glucose > L-arabinose, no caso de serragem de Pinus.
- 4) Se a hidrólise fosfórica é precedida de uma etapa de solvólise ou auto-hidrólise, i.e., simples aquecimento pressurizado dos bagaços suspensos em água, libera-se nesta pré-etapa, preferencialmente L-arabinose. Esta auto-catálise hidrolítica o -

corre por conta do próprio conteúdo nativo de grupos O-acetil, pois embora o ácido acético seja ainda mais débil que o fosfórico, a ocorrência desta pentose na forma furanosídica na cadeia da xilana, a torna extremamente lábil a hidrólise.

5) A ordem de resistência à hidrólise ácida: celulose » glicomanas » heteroxilanas, no que concerne a despolimerização completa dos dois tipos de hemiceluloses, respectivamente representativos de gramíneas e coníferas, pode ser convenientemente levada a cabo, ajustando-se a pressão/temperatura da hidrólise fosfórica a 0,1% v/v, em cerca de 10 atmosferas (185°C).

6) O papel restritivo da lignina quando se tem em vista o duplo objetivo de levar tanto a fração hemicelulósica, quanto a celulósica de bagaço de cana até os respectivos monômeros (D-xilose, por pré-tratamento fosfórico e D-glucose, por celulólise enzimática da lignocelulose residual), ficou claramente evidenciado pela cloração prévia do bagaço nativo, um pré-tratamento alternativo e eficiente para a delignificação.

7) Embora o pré-tratamento fosfórico seja menos destrutivo que aqueles com ácidos fortes, é inevitável a co-geração de substâncias inibitórias ao posterior processo fermentativo. Além de furfural, compostos fenólicos, resultantes da fragmentação parcial da lignina participam deste efeito indesejável. A extração com solvente orgânico (clorofórmio, e em menor grau o acetato de etila) do hidrolisado, ou ainda mais eficientemente, sua clarificação com carvão ativo, promove melhores rendimentos na fermentação, no que toca a consumo dos açúcares livres, crescimento microbiano e conversão a etanol. Esta observação é válida para os tres modelos de levedura: Pachysolen tannophilus, Candida shehatae e Pichia stipitis.

8) Dentro da estratégia proposta, o aproveitamento do ácido fosfórico como co-nutriente ou fator de estimulação foi comprovado, desde que até concentrações finais na faixa de 0,25% favorecem tanto o crescimento da levedura Pachysolen tannophilus, quanto a produção de etanol. No papel de efetor positivo do ânion fosfato, não está necessariamente implicado consumo, e daí

a possível prevalência de um efeito regulatório.

9) No tocante a pH ótimo para a levedura fermentadora de pentoses, Pachysolen tannophilus, um assunto muito controvertido na literatura, na presença de fosfato de amônio, encontramos os valores de 5,0 para crescimento e 4,0 para produção de etanol.

10) Em vista das suspensões clorídrica e sulfúrica de bagaço resultarem em valores significativamente mais acídicos de pH, comparativamente a fosfórica (mantidos os três ácidos em concentração normalizada), a comprovação de qualquer efeito positivo de íons cloreto e/ou sulfato na etapa fermentativa, poderia aconselhar a adoção de uma catálise mista inicial, com a vantagem de menor concentração de ácido ou menor faixa de temperatura / pressão e tempo de residência no reator. Pelo menos, a nível de crescimento da levedura Pachysolen tannophilus algum efeito positivo foi verificado, daí a conveniência de uma exploração de uma alternativa hidrolítica que resultasse, na etapa de neutralização, numa mistura de fosfato, cloreto e sulfato de amônio, como co-nutrientes.

11) O incremento de substrato fermentescível mediante concentração a vácuo dos hidrolisados fosfóricos, além de proporcionar a eliminação, por arraste de vapor, de co-produtos indesejáveis, como o furfural e ácido acético, garante proporcionalmente um crescimento mais vigoroso da biomassa microbiana e, consequentemente maior teor alcoólico final, mesmo com as cepas selvagens testadas como modelo, as quais ainda não foram selecionadas para melhor resposta frente a condição de maior osmolaridade de substrato.

12) A seleção da idade do inóculo de Pachysolen tannophilus, e.g., de fase estacionária acarreta, crescimento mais vigoroso no mosto fosfórico e produção de etanol antecipada, mas com o inconveniente de ter o seu consumo acelerado.

13) Nos fermentados fosfóricos não foi constatada a presença de quantidades significativas de xilitol.



14) Os resultados de fermentação de hidrolisados fosfóricos neutralizados, mais significativos para a produção de etanol foram preliminarmente conduzidos após moderada suplementação com os sais de Vogel (1/4 da dosagem preconizada na literatura) ou extrato de levedura (1/10 a 1/5 da proporção comumente referida ao teor de carboidratos). Logrou-se entretanto, no caso de uso de neutralizado de cana sem nenhum pós-tratamento adicional ou inclusão de suplementação, um ligeiro crescimento de Pachysolen tannophilus. Para o caso de hidrolisado de Pinus, nas mesmas condições, além de vigoroso crescimento, detectou-se formação de etanol na ordem de 0,33g de solvente/g pentose + hexose consumida, comparativamente a melhor produtividade obtida nas fermentações suplementadas: 0,375 e 0,258g/g de pentose consumida, caso da Pichia stipitis, respectivamente em D-xilose p.a. ou hidrolisado de cana tratado com carvão ativo, ambos suplementados com sais de Vogel a 0,5ml% e extrato de levedura a 0,1g%.

15) Embora o pré-tratamento fosfórico não tenha como estratégia paralela a hidrólise sequer parcial da celulose, esta tem sua sociação com a lignina e/ou cristalinidade favoravelmente afetada para fins de celulólise enzimática. Em cinética de hidrólise fosfórica mais enérgica, recupera-se uma lignocelulose residual completamente despolimerizável por enzimas comerciais. Para tanto, é fundamental evitar-se um dessecamento da lignocelulose, que deve ser processada enquanto úmida.

## APÊNDICE

Temperaturas do vapor saturado da água em ° Centígrados, correspondentes a pressões de manômetro, em atmosferas. Zero atmosfera de pressão no manômetro, corresponde a uma pressão absoluta de 1 atmosfera (760mm Hg)\*.

T	Pressão	T	Pressão	T	Pressão	T	Pressão
100	0,000	133	1,921	166	6,114	199	14,062
101	0,036	134	2,008	167	6,291	200	14,380
102	0,074	135	2,097	168	6,472	201	14,703
103	0,112	136	2,188	169	6,656	202	15,031
104	0,152	137	2,282	170	6,844	203	15,364
105	0,193	138	2,378	171	7,036	204	15,703
106	0,235	139	2,476	172	7,231	205	16,047
107	0,278	140	2,576	173	7,430	206	16,396
108	0,322	141	2,678	174	7,632	207	16,751
109	0,368	142	2,783	175	7,839	208	17,111
110	0,415	143	2,890	176	8,049	209	17,477
111	0,463	144	3,000	177	8,263	210	17,848
112	0,513	145	3,113	178	8,481	211	18,226
113	0,564	146	3,227	179	8,703	212	18,608
114	0,616	147	3,344	180	8,929	213	18,997
115	0,670	148	3,464	181	9,150	214	19,391
116	0,726	149	3,587	182	9,394	215	19,791
117	0,782	150	3,712	183	9,663	216	20,197
118	0,841	151	3,840	184	9,876	217	20,690
119	0,901	152	3,971	185	10,123	218	21,027
120	0,962	153	4,104	186	10,374	219	21,452
121	1,025	154	4,240	187	10,630	220	21,882
122	1,091	155	4,380	188	10,885	221	22,319
123	1,157	156	4,522	189	11,155	222	22,761
124	1,225	157	4,667	190	11,425	223	23,210
125	1,295	158	4,815	191	11,699	224	23,666
126	1,366	159	4,966	192	11,977	225	24,128
127	1,430	160	5,120	193	12,261	226	24,596
128	1,515	161	5,278	194	12,549	227	25,071
129	1,592	162	5,439	195	12,842	228	25,552
130	1,671	163	5,603	196	13,139	229	26,040
131	1,753	164	5,770	197	13,441		
132	1,836	165	5,940	198	13,749		

\* BLAS, L. Agenda del Químico. Madrid, Aguilar S.A., 1963.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERSON, M.; ZIOBRO, M.; GADDY, J.L. Two stage acid hydrolysis of biomass. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 103 - 112, 1981.
2. AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. The fungi. Vol. IVA. New York, Academic Press, 1973. 621p.
3. ALLEN, D.C.; GRETHLEIN, H.E.; CONVERSE, A.O. Process studies for enzymatic hydrolysis using high solid slurries of acid pretreated mixed hardwood. Biotechnol. Bioeng. Symp., 13: 99-111, 1983.
4. ALVIM, P.T. & ALVIM, R. Energia a partir de plantas: um novo desafio para a agricultura tropical. Cult. Energ. Biomassa, 7: 17-27, 1984.
5. ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. Adv. Carbohydr. Chem., 14: 429-468, 1959.
6. AZHAR, A.F.; BERY, M.K.; COLCORD, A.R.; ROBERTS, R.S.; CORBITT, G.V. Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 293-300, 1981.
7. BAHL, H.; ANDERSCH, W.; GOTTSCHALK, G. Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum in a two stage phosphate limited chemostat. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15: 201-205, 1982.
8. BAILLARGEON, M.W.; JANSEN, N.B.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Effect of oxygen uptake on ethanol production by a xylose fermenting yeast mutant, Candida sp XF 217. Biotechnol. Lett., 5(5): 339-344, 1983.

9. BARBOSA, A.M. Atividade xilanolítica dos fungos Dactylium dendroides e Fusarium oxysporum. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da U.F.Pr., 1984.
10. BARNETT, J.A. The utilization of sugars by yeasts. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 125-234, 1976.
11. BAUGH, K.D.; BACHMANN, A.; EVERHART, T.; MC CARTY, P.L. Characterization and methane fermentation of products from staged autohydrolysis of wood. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 113-124, 1981.
12. BEAVEN, M.J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A.H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fattyacyl composition in Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol., 128: 1447-1455, 1982.
13. BECK, M.J. Effect of intermittent feeding of cellulose hydrolysate to hemicellulose hydrolysate on ethanol yield by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett., 8 (7): 513-516, 1986.
14. \_\_\_\_\_. Factors affecting efficiency of biomass fermentation to ethanol. Biotechnol. Bioeng. Symp., 17: 617 - 627, 1986.
15. BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enz. Microbiol. Technol., 3: 90-104, 1981.
16. BLAKE, J.D.; MURPHY, P.T.; RICHARDS, G.N. Isolation and A/B classification of hemicelluloses. Carbohydr. Res., 16: 49-57, 1971.
17. BROWNELL, H.H. & SADDLER, J.N. Steam-explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp., 14: 55-68, 1984.
18. CARVALHO, J.F. Biomassas como fonte de energia. Cult. Energ. Biomassa, 6: 29-40, 1983.
19. CASEBIER, R.L.; HAMILTON, J.K.; HERGERT, H.L. Chemistry

- and mechanism of water prehydrolysis on Southern Pine wood. TAPPI, 52(12): 2369-2377, 1969.
20. CHAHAL, D.B. Enzymatic hydrolysis of cellulose. "State of the art". Ottawa, NRCC, 1982. 74p.
  21. \_\_\_\_\_. Bioconversion of hemicelluloses into useful products in an integrated process for food/feed and fuel (ethanol) production from biomass. Biotechnol. Bioeng. Symp., 14: 425-433, 1984.
  22. CHAN, E.C.; UENG, P.P.; CHEN, L. D-xylose fermentation to ethanol by Schizosaccharomyces pombe cloned with xylose-isomerase gene. Biotechnol. Lett., 8(4): 231-234, 1986.
  23. CHANG, M.M.; CHOU, T.Y.C.; TSAO, G.T. Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. Adv. Biochem. Eng., 20: 14-42, 1981.
  24. CHEN, L.F. & GONG, C.S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate to xylitol by a hydrolyzate - acclimatized yeast. J. Food Science, 50(1): 226-228, 1985.
  25. CHIANG, L.C.; HSIAO, H.Y.; UENG, P.P.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. Ethanol production from xylose by enzymic isomerization and fermentation. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 263-274, 1981.
  26. CHUNG, I.S.; LEE, Y.Y.; BECK, M.J. High-cell fermentation of xylose to ethanol by Pachysolen tannophilus using continuous cell recycle. Biotechnol. Bioeng. Symp., 17: 391-400, 1986.
  27. CORRÊA, J.B.C. Estudos estruturais sobre hemiceluloses de Mimosa scabrella (bracatinga). Tese - U.F.Pr., 1985.
  28. CORRÊA, J.B.C.; GOMES, S.L.; GEBARA, M. Structural features of the hemicellulose A from the stem of Mimosa bracinga. Carbohydr. Res., 60: 337-343, 1978.

29. COWLING, E.B. & KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6: 95-123, 1976.
30. CRAWFORD, D.L. Microbial conversions of lignin to useful chemicals using a lignin-degrading Streptomyces. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 275-291, 1981.
31. CUNNINGHAM, R.L.; CARR, M.E.; BAGBY, M.O. Hemicellulose isolation from annual plants. Biotechnol. Bioeng. Symp., 17: 159-168, 1986.
32. DALE, B.E. & MOREIRA, M.J. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp., 12: 31-43, 1982.
33. DEBUS, D.; METHNER, H.; SCHULZE, D.; DELLWEG, H. Fermentation of xylose with the yeast Pachysolen tannophilus. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17: 287-291, 1983.
34. DEKKER, F.F.H. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by Trichoderma reesei and enzymic saccharification of hemicellulose. Biotechnol. Bioeng., 25: 1127-1146, 1983.
35. \_\_\_\_\_. Ethanol production from D-xylose and other sugars by the yeast Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett., 4: 411-416, 1982.
36. \_\_\_\_\_. Lipid-enhanced ethanol production from xylose by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng., 28: 605 - 608, 1986.
37. \_\_\_\_\_. Developments on enzymatic hydrolysis of cellulosic materials and aspects of the fermentation of produced sugars. In: IIº Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, PR., Brasil. 1985. 81p.
38. DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. The effect of aeration on D-xylose fermentation by Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis, Kluyveromyces marxianus and Candida

- shehatae. Biotechnol. Lett., 8(12): 897-900, 1986.
39. DELLWEG, H.; RIZZI, M.; METHNER, H.; DEBUS, D. Xylose fermentation by yeasts: comparison of Pachysolen tannophilus and Pichia stipitis. Biotechnol. Lett., 6(6): 395-400, 1984.
  40. DEL ROSARIO, E.J. Kinetics of alcohol fermentation at high yeast levels. Biotechnol. Bioeng., 21: 1477-1482, 1979.
  41. DETROY, R.W.; CUNNINGHAM, R.L.; BOTHAST, R.J.; BAGBY, M.O.; HERMAN, A. Bioconversion of wheat straw cellulose/hemicellulose to ethanol by Saccharomyces uvarum and Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng., 24: 1105-1113, 1982.
  42. DETROY, R.W.; CUNNINGHAM, R.L.; HERMAN, A.I. Fermentation of wheat straw hemicelluloses to ethanol by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng. Symp., 12: 81-89, 1982.
  43. DEVERELL, K.F. Ethanol production from wood hydrolyzates using Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett., 5(7): 475-480, 1983.
  44. DU PREEZ, J.C. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of Candida shehatae. Biotechnol. Lett., 5(5): 357-362, 1983.
  45. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; RIBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
  46. EVELEIGH, D.E. The microbial production of industrial chemicals. Sci. Am., 245: 120-130, 1981.
  47. FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. Evaluation of pre-treatments for enzymatic conversion of agricultural residues. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 29-45, 1981.
  48. \_\_\_\_\_. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Adv. Biochem. Eng., 23:

157-187, 1982.

49. FARID, M.A.; SHAKER, H.M.; EL-DIWANY, A.I. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Enz. Microbiol. Technol., 5(6): 421-424, 1983.
50. FENGEL, D. & WEGENER, G. Wood. New York, Walter de Gruyter, 1984. 406p.
51. FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C.; GALLOTTI, B.J.; DUARTE, J.H.; IACOMINI, M.; BARBOSA, A.M. Fermentação de hidrolisados ácidos parciais de bagaço de Saccharum officinarum, pelos gêneros Pachysolen e Fusarium. In: Vº Simpósio Nacional de Fermentação. Viçosa, Minas Gerais, 1982.
52. FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C.; DUARTE, J.H.; BARBOSA, A.M.; BLUMEL, M. Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses. Biotechnol. Bioeng. Symp., 14: 175-184, 1984.
53. GAIL GREENWALD, C.; NYSTRON, J.M.; LEE, L.S. Yield predictions for various types of acid hydrolysis reactors. Biotechnol. Bioeng. Symp., 13: 27-39, 1983.
54. GALLOTTI, B.J. & FERENCZ, G. Método analítico em semi-micro escala para avaliação do etanol. Trib. Farm., 47(1): 3-9, 1979.
55. GARG, S.K. & NEELAKANTAN, S. Bioconversion of sugarcane bagasse for cellulase enzyme and microbial protein production. J. Food Technol., 17: 271-279, 1982.
56. GIBBONS, W.R.; WESTBY, C.A.; DOBBS, T.L. Intermediate scale, semicontinuous solid-phase fermentation process for production of fuel ethanol from sweet sorghum. Appl. Environ. Microbiol., 51(1): 115-122, 1986.
57. GIBBS, M.; COCHRANE, V.W.; PAEGE, L.M.; WOLIN, H. Fermentation of D-xylose-1-C<sup>14</sup> by Fusarium lini Bolley. Arch. Biochem., 50: 237-242, 1954.



58. GOLDSTEIN, I.S. Chemicals from cellulose. In: GOLDSTEIN, I.S. Organic chemicals from biomass. Boca Raton, CRC Press, 1981. p. 102-124.
59. \_\_\_\_\_. Composition of biomass. In: \_\_\_\_\_. Organic chemicals from biomass. Boca Raton, CRC Press, 1981. p. 10-18.
60. GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol., 41(2): 430-436, 1981.
61. GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Conversion of hemicellulose carbohydrates. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 20: 93-118, 1981.
62. GONG, C.S.; CLAYPOOL, T.A.; MC CRACKEN, L.D.; MAUN, C.M.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. Biotechnol. Bioeng., 25: 85-102, 1983.
63. GONG, C.S.; LADISH, M.R.; TSAO, G.T. Production of ethanol from wood hemicellulose hydrolyzates by a xylose-fermenting yeast mutant, Candida sp XF 217. Biotechnol. Lett., 3(11): 657-662, 1981.
64. GONG, C.S.; MC CRACKEN, L.D.; TSAO, G.T. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermenting yeast mutant, Candida sp XF 217. Biotechnol. Lett., 3: 245 - 250. 1981.
65. GROHMANN, K.; HIMMEL, M.; RIVARD, C.; TUCKER, M.; BAKER, J. Chemical mechanical methods for the enhanced utilization of straw. Biotechnol. Bioeng. Symp., 14: 137-157, 1984.
66. GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Dilute acid pretreatment of biomass at high solids concentrations. Biotech. Bioeng. Symp., 17: 135-151, 1986.
67. \_\_\_\_\_. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. Biotechnol. Bioeng. Symp., 17: 59-80, 1986.

68. HAJNY, G.J. Biological utilization of wood for production of chemicals and foodstuffs. Madison, WIS, 1981. 65p.
69. HAMISSA, F.A.; EL-DIWANY, A.I.; SHAKER, H.M.; EL-REFAI, A. M.H. Improvment of the nutritional value of sugarcane bagasse by simple solid state fermentation. Microbios Lett., 26: 129-133, 1984.
70. HAN, Y.W. & CALLIHAN, C.D. Cellulose fermentation: effect of substrate pretreatment on microbial growth. Appl. Microbiol., 27(1): 159-165, 1974.
71. HORTON, G.L.; RIVERS, D.B.; EMERT, G.H. Preparation of cellulose for enzymatic conversion. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 19(3): 422-429, 1980.
72. JACOB, W.S. Madeira, uma opção para o carvão mineral e o óleo combustível. Cult. Energ. Biomassa, 2: 34-37, 1982.
73. JANSSENS, J.H.; BURRIS, N.; WOODWARD, A.; BAILEY, R.B. Lipid-enhanced ethanol production by Kluyveromyces fragilis. Appl. Environ. Microbiol., 45: 598-602, 1983.
74. JANSEN, N.B. & TSAO, G.T. Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by Klebsiella pneumoniae. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 85-99, 1983.
75. JANSHEKAR, H. & FIECHTER, A. Lignin: biosynthesis, application and biodegradation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 119-178, 1983.
76. JASBERG, B.K.; MONTGOMERY, R.R.; ANDERSON, R.A. Preservation of sweet sorghum biomass. Biotechnol. Bioeng. Symp., 13: 113-120, 1983.
77. JEFFRIES, T.W. A comparison of Candida tropicalis and Pachysolen tannophilus for conversion of xylose to ethanol. Biotechnol. Bioeng. Symp., 12: 103-110, 1982.
78. \_\_\_\_\_. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by Candida tropicalis. Biotechnol. Lett., 3(5): 213-218, 1981.

79. \_\_\_\_\_. Effects of culture conditions on the fermentation of xylose to ethanol by Candida shehatae. Biotechnol. Bioeng. Symp., 15: 149-166, 1985.
80. \_\_\_\_\_. Fermentation of xylulose to ethanol using xylose isomerase and yeasts. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 315-324, 1981.
81. \_\_\_\_\_. Parameters affecting ethanol production by yeasts. In: LOWENSTEIN, M.Z. Energy applications of biomass: Proc. Nat. Meet. on biomass R&D for energy applications. New York, Elsevier Publ., 1985. p. 231-252.
82. \_\_\_\_\_. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 1-32, 1983.
83. KABEL, J.J.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Modeling of xylose fermentation to ethanol by sequential isomerization and fermentation. Biotechnol. Bioeng. Symp., 13: 315-329, 1983.
84. KATO, N. & SHIBASAKI, I. Production of antimicrobial substances by heat treatment of xylose solution. J. Ferment. Technol., 52(3): 177-184, 1974.
85. KHAN, A.S.; ARORA, H.L.; CARIOCA, J.O.B. Um novo modelo para a produção integrada de energia e alimentos. Cult. Energ. Biomassa, 2: 20-27, 1982.
86. KLEI, H.E.; SUNDSTROM, D.W.; MILLER, J.E. Fermentation by Clostridium acetobutylicum under carbon dioxide pressure. Biotechnol. Bioeng. Symp., 14: 353-364, 1984.
87. KNAPPERT, D.; GRETHLEIN, H.; CONVERSE, A. Partial acid hydrolysis of poplar wood as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 67-77, 1981.
88. KURTZMAN, C.P. Biology and physiology of the D-xylose fermenting yeast Pachysolen tannophilus. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 56-83, 1983.
89. LEE, H.; BIELY, P.; LATTA, R.K.; BARBOSA, M.F.S.; SCHNEIDER, H. Utilization of xylan by yeasts and its conversion to

- ethanol by Pichia stipitis strains. Appl. Environ. Microbiol., 52(2): 320-324, 1986.
90. LEE, H.; JAMES, A.P.; ZAHAB, D.M.; MAHMOURIDES, G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Mutants of Pachysolen tannophilus with improved production of ethanol from D-xylose. Appl. Environ. Microbiol., 51(6): 1252-1258, 1986.
  91. LEE, Y.Y.; LIN, C.M.; JOHNSON, T.; CHAMBERS, R.P. Selective hydrolysis of hardwood hemicellulose by acids. Biotechnol. Bioeng. Symp., 8: 75-88, 1978.
  92. LEONARD, R.H. & HAJNY, G.J. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. Ind. Eng. Chem., 37(4): 390-395, 1945.
  93. LINDEN, J.C.; MOREIRA, A.R.; SMITH, D.H.; HEDRICK, W.S.; VILLET, R.H. Enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic component from vegetative forage crops. Biotechnol. Bioeng. Symp., 10: 199-212, 1980.
  94. LINKO, Y.Y.; KAUTOLA, H.; UOTILA, S.; LINKO, P. Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized Pichia stipitis yeast. Biotechnol. Lett., 8(1): 47-52, 1986.
  95. LITCHFIELD, J.H. Technical and economical prospects for industrial protein in coming decades. In: International Symposium on Single-Cell Proteins. Paris, Lavoisier, 1983. p. 9-33.
  96. LODDER, J. The yeasts. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1970. 138p.
  97. LOUGHRAN, G.A.; SOODAK, M.; NORD, F.F. Fermentation of wood hydrolyzates by yeast and Fusaria. Arch. Biochem. Biophys., 6: 163-164, 1945.
  98. MALESZKA, R. & SCHNEIDER, H. Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of Pachysolen tannophilus growing on D-xylose. Appl. Environ. Microbiol., 44(4): 909-912, 1982.

99. MALESZKA, R.; VELIKY, I.A.; SCHNEIDER, H. Enhanced rate of ethanol production from D-xylose using recycled or immobilized cells of Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett., 3(8): 415-420, 1981.
100. MALESZKA, R.; JAMES, A.P.; SCHNEIDER, H. Ethanol production from various sugars by strains of Pachysolen tannophilus bearing different numbers of chromosomes. J. Gen. Microbiol., 129: 2495-2500, 1983.
101. MALESZKA, R. & SCHNEIDER, H. Fermentation of D-xylose, xylitol and D-xylulose by yeasts. Can. J. Microbiol., 28(3): 360-363, 1982.
102. MC CRACKEN, L.D. & GONG, C.S. D-xylose metabolism by mutant strains of Candida sp. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 33-55, 1983.
103. \_\_\_\_\_. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeasts. Biotechnol. Bioeng. Symp., 12: 91-102, 1982.
104. MARGARITIS, A. & BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by Kluyveromyces marxianus strains. Appl. Environ. Microbiol., 44(5): 1039-1041, 1982.
105. NEIRINCK, L.G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Alcohol production from sugar mixtures by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng. Symp., 12: 161-169, 1982.
106. \_\_\_\_\_. The requirement of oxygen for incorporation of carbon from D-xylose and D-glucose by Pachysolen tannophilus. Arch. Biochem. Biophys., 228(1):13-21, 1984.
107. NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 375-380, 1944.
108. NIGAM, J.N.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M.A. Aerobic fermentation of D-xylose to ethanol by Clavispora sp. Appl. Environ. Microbiol., 50(4): 763-766, 1985.

109. NORD, F.F. & MULL, R.P. Recent progress in the biochemistry of Fusaria. Adv. Enzymol., 5: 165-205, 1945.
110. NORTHCOTE, D.H. Control of cell wall formation during growth. In: Biochemistry of plant cell walls. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. p. 177-197.
111. O'DWYER, M.H. The hemicelluloses. Part IV: The hemicelluloses of beech wood. Biochem J., 20: 656-664, 1926.
112. OLIVEIRA JR, L.L. Coque e álcool da madeira - perspectivas da Coalbra S/A. Cult. Energ. Biomassa, 3: 10-13 , 1982.
113. \_\_\_\_\_. Sistemas agroindustriais integrados. Cult. Energ. Biomassa, 1: 14-16, 1981.
114. PAREKH, S. & WAYMAN, M. Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by Candida shehatae and Pichia stipitis. Biotechnol. Lett., 8(8): 597-600, 1986.
115. PEREIRA, A.R. Uso da biomassa e seus reflexos na economia. Cult. Energ. Biomassa, 8: 20-30, 1984.
116. POURQUIE, J. & VANDECASTEELE, J.P. Conversão dos compostos lignocelulósicos por hidrólise enzimática e fermentação acetona-butanol. In: SCRIBAN, R. Biotecnologia. São Paulo, Editora Manole, 1985. p. 427-440.
117. PRODUÇÃO de celulasas e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. 305p. s.n.t. Curso ministrado na Bioferm , Montes Claros, M.G., de 20-30 de setembro de 1983.
118. PUNNAPAYAK, H. & EMERT, G.H. Use of Pachysolen tannophilus in simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosics. Biotechnol. Lett., 8(1): 63-66, 1986.
119. RAO, K.K. & TRIVEDI, L.S. Sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with Fusarium sp cellulase. Ind. J. Microbiol., 21(3): 224-225, 1981.
120. RASK, N. Biomassa: sua utilização como alimento e/ou combustível. Cult. Energ. Biomassa, 3: 24-34, 1982.

121. REICHER, F. Estudos sobre a localização de grupos O-acetílicos e de complexos lignina-xilana em hemiceluloses nativas de Mimosa scabrella (Bracatinga). Tese-UFPr. 1984.
122. REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of Mimosa scabrella (bracatinga). A study of O-acetyl groups migration. Carbohydr. Res., 135: 129-140, 1984.
123. REID, J.S.G. & WILKIE, K.C.B. Polysaccharides of the oat plant in relationship to plant growth. Phytochemistry, 8: 2045-2051, 1969.
124. ROGERS, P.L.; LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E. Ethanol production by Zymomonas mobilis. Adv. Biochem. Eng., 23: 37-84, 1982.
125. ROMANO, S. Energia da biomassa. Cult. Energ. Biomassa, 4: 26-32, 1982.
126. ROSENBERG, S.L. Fermentation of sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. Enzyme Microbiol. Technol., 2: 185-193, 1980.
127. RUGG, B.; ARMSTRONG, P.; STANTON, R. The New York University continuous acid hydrolysis. In: KLAS, D.L. & EMERT, G.H. Fuels from biomass and wastes. Michigan, Ann Arbor Science Publishers, 1981. p. 311-325.
128. SADDLER, J.N.; YU, E.K.C.; MES-HARTREE, M.; LEVITIN, N.; BROWNELL, H.H. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. Appl. Environ. Microbiol., 45(1): 153-160, 1983.
129. SADDLER, J.N.; MES-HARTREE, M.; YU, E.K.C.; BROWNELL, H.H. Enzymatic hydrolysis of various pretreated lignocellulosic substrates and the fermentation of the liberated sugars to ethanol and butanediol. Biotechnol. Bioeng. Symp., 13: 225-238, 1983.

130. SARKANEN, K.V. & LUDWIG, C.H. Lignins: Occurence, formation, structure and reactions. New York, Wiley Interscience, 1971. 916p.
131. SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. A quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37: 1602-1604, 1965.
132. SCHNEIDER, H.; MAHMOURIDES, G.; LABELLE, J.L.; LEE, H.; MAKI, N.; MC NEILL, H.J. Correlation between limitation of growth of Pachysolen tannophilus on D-xylose with the formation of ethanol and other products. Biotechnol. Lett., 7(5): 361-364, 1985.
133. SCHNEIDER, H.; MALESZKA, R.; NEIRINCK, L.; VELIKY, I.A.; WANG, P.Y.; CHAN, Y.K. Ethanol production from D-xylose and several other carbohydrates by Pachysolen tannophilus and other yeasts. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 57-71, 1983.
134. SCHNEIDER, H.; WANG, P.Y.; CHAN, Y.K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett., 3(2): 89-92, 1981.
135. SCHVESTER, P.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Xylose fermentation to ethanol by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng. Symp., 13: 131-152, 1983.
136. SELVENDRAN, R.R.; STEVENS, B.J.H.; O'NEILL, M.A. Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. In: Biochemistry of plant cell walls. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. p. 39-78.
137. SILVA, J.G.S. O álcool etílico como combustível. Ciência e Cultura, 28: 1051-1057, 1976.
138. SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; VAN CAUWENBERGE, J.E.; KURTZMAN, C.P. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng., 24: 371-384, 1982.



139. SOLTES, E.J.; WILEY, A.T.; KENNY LIN, S.C. Biomass pyrolysis - Towards and understanding of its versatility and potenciales. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 125-136, 1981.
140. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160: 61-68, 1945.
141. SRINIVASAN, V.R. & HAN, Y.W. Utilization of bagasse. In: HAJNY, G.J. & REESE, E.T. Cellulases and their applications. Atlanta, American Chemical Soc., 1969. p. 447 - 460.
142. STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHIMPER, A.F.W. Tratado de Botânica. 6ª ed. Barcelona, Editorial Marin, 1974. 798p.
143. SUIHKO, M.L. & DRAZIC, M. Pentose fermentation by yeasts. Biotechnol. Lett., 5(2): 107-112, 1983.
144. SUIHKO, M.L.; SUOMALAINEN, I.; ENARI, T.M. D-xylose catabolism in Fusarium oxysporum. Biotechnol. Lett., 5(8): 525-530, 1983.
145. SUIHKO, M.L. & ENARI, T.M. The production of ethanol from D-glucose and D-xylose by different Fusarium strains. Biotechnol. Lett., 3(12): 723-728, 1981.
146. THOMPSON, N.S. Chemicals from hemicelluloses. In: GOLD - STEIN, I.S. Organic chemicals from biomass. Boca Raton, CRC Press, 1981. p. 126-141.
147. TIMMEL, T.E. Wood hemicelluloses: Part I. Adv. Carbohydr. Chem., 19: 247-302, 1964.
148. \_\_\_\_\_. Wood hemicelluloses: Part II. Adv. Carbohydr. Chem., 20: 410-483, 1965.
149. TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, JP.; SCHEFFERS, W.A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. Appl. Environ. Microbiol., 47(6): 1221-1223, 1984.

150. TOUSTER, O. Pyridine catalysed isomerisation of xylose. Meth. Carbohydr. Chem., 1: 98-101, 1962.
151. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444-445, 1950.
152. UENG, P.P. & GONG, C.S. Ethanol production from pentoses and sugar-cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by Mucor and Fusarium species. Enz. Microbiol. Technol., 4: 169-171, 1982.
153. UENG, P.P.; VOLPP, K.J.; TUCKER, J.V.; GONG, C.S.; CHEN, L.F. Molecular cloning of the Escherichia coli gene encoding xylose isomerase. Biotechnol. Lett., 7(3): 153-158, 1985.
154. VOGEL, H.J. A convenient growth medium for Neurospora crassa. Microbiol. Gen. Bull., 13: 42-43, 1956.
155. VOLESKY, B. & SZCZESNY, T. Bacterial conversion of pentose sugars to acetone and butanol. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27: 101-118, 1983.
156. WALSETH, C.S. Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. TAPPI, 35(5): 228-233, 1952.
157. WANG, P.Y. & SCHNEIDER, H. Growth of yeasts on D-xylulose. Can. J. Microbiol., 26: 1165-1168, 1980.
158. WANG, P.Y.; SHOPSIS, C.; SCHNEIDER, H. Fermentation of a pentose by yeasts. Biochem. Biophys. Res. Commun., 94(1): 248-254, 1980.
159. WANG, H.Y.; ROBINSON, F.M.; LEE, S.S. Enhanced alcohol production through on-line extraction. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 555-556, 1981.
160. WATSON, N.E.; PRIOR, B.A.; LATEGAN, P.M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by Pachysolen tannophilus. Enz. Microbiol. Technol., 6(10): 451-456, 1984.

161. WAYMAN, M. & TSUYUKI, S.T. Fermentation of xylose to ethanol by Candida shehatae. Biotechnol. Bioeng. Symp., 15: 167-177, 1985.
162. WHITE, M.G. & WILLAMAN, J.J. Fermentation of pentoses by Fusarium lini. Biochem. J., 22: 583-591, 1928.
163. WILKIE, K.C.B. New perspectives on non-cellulosic cell - wall polisaccharides of land plants. In: Biochemistry of plant cell walls. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. p. 1-37.
164. \_\_\_\_\_. The hemicelluloses of grasses and cereals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 36: 215-264, 1979.
165. WONG, T.S. & MANDERSON, G.J. The ethanolic fermentation of 5-carbon sugars by yeast. In: MANDERSON, G.J. The conversion of C-5 sugars to ethanol. New Zealand, Massey University, 1985. p. 9-41.
166. WRIGHT, J.D. & D'AGINCOURT, C.G. Evaluation of sulfuric acid hydrolysis processes for alcohol fuel production. Biotechnol. Bioeng. Symp., 14: 105-123, 1984.
167. WU, J.F.; LASTICK, S.M.; UPDEGRAFF, D.M. Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus. Nature, 321: 887-888, 1986.
168. YU, E.K.C. & SADDLER, J.N. Enhanced production of 2,3 - butanediol by Klebsiella pneumoniae grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. Appl. Environ. Microbiol., 44(4): 777-784, 1982.
169. \_\_\_\_\_. Power solvent production by Klebsiella pneumoniae grown on sugars present in wood hemicellulose. Biotechnol. Lett., 4(2): 121-126, 1982.